

Schnelle homogene Temperierung von Mikrotiterplatten zur photometrischen Messung von Analysengut

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegt der Fakultät für Maschinenbau
der Technischen Universität Ilmenau

von Dipl.-Ing. Mathias Bethge
geboren am 24. Dezember 1958 in Rostock

Gutachter:	Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Grünwald, Ilmenau Univ.-Prof. Dr. med. habil. Horn, Jena Prof. Dr.-Ing. habil. Richter, Leipzig
Datum des Einreichens:	16.01.2002
Datum der wissenschaftlichen Aussprache:	10.12.2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Überblick	4
1.1. Einführung	4
1.2. Photometrie	5
1.3. Zweck der Temperierung von MTP mit Analysengut	7
1.4. Stand der Technik	9
1.5. Aufgabenstellung	14
2. Temperaturmessung im Well	15
2.1. Funktionsweise des optischen Thermometers	16
2.1.1. absorbanzmessender Reader	17
2.1.2. fluoreszenzmessender Reader	18
2.2. Ermittlung der Kalibrierkurven	20
2.2.1. absorbanzmessender Reader	20
2.2.2. fluoreszenzmessender Reader	21
2.3. Berechnung der Homogenität der Temperaturverteilung	23
2.4. Meßunsicherheit der Kalibrierkurven	25
2.4.1. absorbanzmessender Reader	26
2.4.2. fluoreszenzmessender Reader	31
2.4.3. Das Referenzthermometer	36
2.4.4. Leistungsumsatz im Well durch die zum Messen benutzte Strahlung	37
2.5. Das optische Thermometer im erweiterten Temperaturbereich bei Messung im absorbanzmessenden Reader	39
2.6. Messung während des Aufheizens	43
3. Untersuchung verschiedener Heizverfahren	48
3.1. indirekte Widerstandserwärmung	48
3.1.1. absorbanzmessender Reader	48
3.1.2. fluoreszenzmessender Reader	51
3.1.2.1. Auswahl der MTP, Entwurf von Heizkörper und Dachheizung	51
3.1.2.2. Homogenität und Aufheizzeit	55
3.1.3. vergleichende Betrachtung zum Energieeintrag	58
3.2. Erwärmung durch Infrarot-Strahlung	59
3.2.1. Erwärmung durch Temperaturstrahler niedriger Temperatur (Dunkelstrahler)	59
3.2.2. Erwärmung durch Halogenstrahler (Hellstrahler)	74
3.3. Dielektrische Erwärmung	90
3.3.1. Einfluß der Mikrowellen auf die Enzymaktivität	90
3.3.2. Erwärmung im Mikrowellenfeld	91

4.	Das optimale Heizregime	104
5.1	Zusammenfassung	112
5.2	abstract	113
6.	Literaturverzeichnis	114

Anhänge

A	Das Aktivitätsthermometer	I
B	Versuch der Verbesserung der Temperaturbestimmungsgleichung bei Messung im absorbanzmessenden Reader	III
C	aus der indirekten Widerstandserwärmung abgeleitete Lösungsideen	VI
D	Grundlage der Erwärmung durch Infrarot-Strahlung	VII
E	Erwärmung durch kalte Infrarot-Strahlung	IX
F	Grundlage der dielektrischen Erwärmung	XV
G	Erwärmung im Kondensatorfeld	XVII
H	Induktive Erwärmung	XXII
I	Bestimmung der optimalen Schaltzeiten	XXXI
J	Abkürzungs- und Größenverzeichnis	XXXIII
K	Geräte	XXXV
L	Reagenzien	XXXVI
M	Software	XXXVII

Danksagung

Selbständigkeitserklärung

Thesen

1. Einleitung und Überblick

1.1. Einführung

Für die Untersuchung von Analysengut mit optischen Methoden werden in der Pharmaindustrie, in der Biotechnologie, in medizinischen Laboratorien und Forschungseinrichtungen zur Durchführung von Screeningverfahren häufig Mikrotiterplatten (Abk. MTP) eingesetzt. Sie dienen der Aufnahme des Analysengutes, das auch als Lösung oder Probe bezeichnet wird. Die für die Untersuchung geeigneten Geräte heißen Photometer. Als MTP wird ein Verbund aus meist 96 Sacklöchern, auch Wells genannt, bezeichnet. MTP können mit Strichcode numeriert und mittels unsymmetrischem Grundriß in der Auflageebene orientiert werden. MTP aus Kunststoff können preisgünstig in großer Stückzahl im Spritzgußverfahren hergestellt werden. Eine Sonderform der MTP sind strips à 8 Wells. Die Anordnung von zwölf solcher strips der Fa. Nunc in einem passenden Kunststoffrahmen ergibt praktisch eine MTP mit 96 Wells. Im Umfeld der MTP ist eine Vielzahl von Geräten verfügbar: Reader, Multipipetten, Washer, Zentrifugen, Schüttler, Magnetseparatoren, Dialyse- und Filtriergeräte und Stacker einschließlich dazugehöriger Automatisierungstechnik. Die Konstruktionen der MTP und die der Geräte des Umfeldes sind aufeinander abgestimmt. Diese Eigenschaften machen es möglich, mit Hilfe des Geräteumfeldes die durchzuführenden Testreihen im wesentlichen maschinell ablaufen zu lassen. So können Durchsätze erreicht werden, die bei nötigen manuellen Arbeitsschritten nicht realisiert werden können. Aufgrund maschineller Durchführung wesentlicher Arbeitsgänge der Testreihe wie Befüllen der MTP, Messen und Auswerten entfallen Fehler durch manuelles Hantieren wie Pipettierfehler, Ablesefehler und Fehler durch nicht gleichzeitiges Befüllen.

Weiterhin kann die Anzahl der Wells je MTP erhöht werden. Die gebräuchlichsten Wellzahlen sind 96 ($=8 \cdot 12$) und 384, entstanden aus $(8 \cdot 2) \cdot (12 \cdot 2)$ mit 4 Wells auf der Fläche von einem Well einer 96-Well-MTP. Die in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen beziehen sich auf MTP mit 96 Wells. Andere benutzte Wellzahlen größer als 96 sind 192 ($=8 \cdot 12 \cdot 2$), 864 ($=24 \cdot 36$) und 1536 ($=32 \cdot 48$), immer auf der Grundfläche von $125 \cdot 85 \text{ mm}^2$ einer 96-Well-MTP. Mit der Erhöhung der Wellzahl je MTP wird das Volumen eines einzelnen Wells kleiner. Das kommt dem geringeren Verbrauch von Reagenzien zugute, stellt aber noch höhere Anforderungen an die Laborgerätetechnik. Es gibt Anzeichen für eine weitere Erhöhung der Wellzahl unter Verlassen des Formates der MTP [Köhler u.a. 1998]. Die so entstehende Nanolitertechnik erfordert zum Hantieren des Analysengutes völlig andere Konstruktionsprinzipien als die bisher in der sog. Mikrolitertechnik eingesetzten. Der weitaus größte Anteil der kommerziell angebotenen MTP besteht aus Kunststoff. Bei Verwendung von Wellenlängen unter 340 nm müssen teurere MTP aus Glas eingesetzt werden. MTP haben sich in der letzten Zeit enorm durchgesetzt. Wegen ihrer o.g. Vorteile

entstehen immer mehr Applikationen auf nahezu allen Gebieten der biochemischen und immunologischen Analytik, beispielsweise

- in der Pharmaindustrie: Analyse von Substanzklassen wie Lebensmittelzusätzen, Chemikalien, Arzneimitteln, Zellen, Antikörpern, Nukleinsäuren (DNS), Enzymen, Hormonen, Proteinen, kleinen Molekülen, Aminosäuren und Vitaminen mit etwa 10000 Analysen pro Tag im High Throughput Screening (HTS) und 100000-200000 Analysen im Ultra HTS (UHTS);
- in der medizinischen Diagnostik: Analyse von Tumormarkern, Hormonen, Viren und Antikörpern mittels Enzymimmuntests; Ermittlung von Blutgruppen und Rheumafaktoren mittels Agglutinationsreaktionen; Substanznachweis durch Polymerase-Kettenreaktion (Abk. PCR);
- im Umweltschutz: Analyse mikrobieller Verunreinigungen aller Substanzklassen.

1.2. Photometrie

Allen Applikationen ist die mittelbare Auswertung der in der MTP ablaufenden bzw. abgelaufenen chemischen Reaktion durch Messung einer physikalisch günstig meßbaren Größe gemeinsam. Diese Größe kann die Absorbanz, die Fluoreszenz und die Chemilumineszenz der in der MTP befindlichen Lösung sein. Die Absorbanz, auch Extinktion, ist der dekadische Logarithmus des Quotienten aus einfallender und durchgelassener Strahlung. Der Kehrwert des Quotienten ist die Reintransmission. Die Lumineszenz ist die Aussendung von Licht ohne gleichzeitig erhöhter Temperatur. Untergruppen der Lumineszenz sind Fluoreszenz, Phosphoreszenz und Chemilumineszenz. In dieser Arbeit wird die Eigenschaft fluoreszierender Stoffe ausgenutzt, i.a. längerwellige als die zur Anregung benutzte Strahlung auszusenden (Stokessche Regel). Bei der Fluoreszenz klingt die Aussendung 10^{-9} s bis 10^{-7} s nach Ende der Anregung ab, bei der Phosphoreszenz entsprechend 10^{-6} s bis 10^2 s, Abklingzeiten nach [o.V. Handbuch LS50B]. Chemilumineszenz ist die Anregung durch Energie aus chemischen Reaktionen.

Der Begriff MTP-Reader oder kurz Reader bezeichnet ein Gerät, welches die Absorbanz, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz von Proben in MTP messen kann. Ein absorbanzmessender Reader bestrahlt die MTP von unten oder oben und mißt die durchgelassene Strahlung oben bzw. unten. In beiden Fällen muß die Strahlung durch den Wellboden und durch eine evtl. auf die MTP aufgebrachte Abdeckung hindurch. Der Lichtweg führt geradlinig vom Sender zum Empfänger und senkrecht durch das Well, d.h., der MTP-Reader mißt die über die Schichtdicke der wäßrigen Lösung integrierte Größe Absorbanz je Schichtdickenelement. So messende Geräte heißen Vertikalphotometer. Damit ist dieser Readertyp auf einen bei der interessierenden Wellenlänge möglichst gut durchlässigen MTP-Werkstoff angewiesen. Der Durchmesser des parallelen Strahlenbündels ist groß genug, um dem Detektor eine Integration über den Bodendurchmesser des Wells zu ermöglichen. So

konstruierte Reader heißen deshalb Reader mit großem Strahldurchmesser. Um radiale Absorbanzgradienten zu vermeiden, muß die Lösung vor der Messung gut durchmischt werden. Das geschieht durch Schütteln. Die für die Messung benötigte Strahlung wird z.B. durch eine Halogenlampe erzeugt. Die Wellenlänge, bei der gemessen wird, kann z.B. durch einen Filter festgelegt werden und liegt im sichtbaren oder nahen UV-Bereich.

Da aufgrund der Konstruktion einer MTP nur senkrecht gemessen werden kann, zählen die absorbanzmessenden Reader zur Gruppe der Vertikalphotometer.

Weiterhin sind Geräte bekannt, in denen ein Strahldurchmesser realisiert ist, der wesentlich kleiner als der Bodendurchmesser des Wells ist. Diese Geräte rastern die Bodenfläche eines jeden Wells ab, um einzelne nicht lösliche Objekte zu erkennen. Diese werden als Konglomerate, med.: Agglutinate, bezeichnet. In dieser Arbeit werden nur MTP-Reader mit großem Strahldurchmesser betrachtet, weil das verwendete Analysengut ausschließlich lösliche Bestandteile enthält.

Ein fluoreszenzmessender Reader führt die Bestrahlung von unten oder oben und die Messung von oben aus. Entsprechend ist eine Doppeloptik oder eine Einfachoptik nötig. Der für diese Arbeit verwendete fluoreszenzmessende Reader bestrahlt und mißt gleichzeitig von oben. Damit sind MTP aus lichtundurchlässigem Werkstoff verwendbar. Die MTP dürfen bei der interessierenden Wellenlänge möglichst nicht fluoreszieren. Die Anregungsstrahlung gelangt auf die Lösungsoberfläche. Die Aussendung erfolgt im wesentlichen ebenfalls von der Lösungsoberfläche. Darunter liegende Volumenanteile weisen sowohl für Anregung als auch für Aussendung Absorbanzen und größere Entfernungen zum Strahler bzw. Detektor auf. Bei der Wahl der Wellenlängen muß beachtet werden, daß die ausgesendete Wellenlänge i.a. größer als die anregende Wellenlänge ist und sich die Durchlaßbereiche beider Kanäle nicht überlappen. Damit wird die Messung von durchgelassenen Anteilen mit Anregungswellenlänge verhindert und der Schutz des empfindlichen Photoempfängers gewährleistet. Die wählbaren Wellenlängen liegen im sichtbaren und nahen UV-Bereich.

Ein chemilumineszenzmessender Reader arbeitet ähnlich wie ein fluoreszenzmessender. Ihm fehlt der optische Kanal für die Anregung. Gemessen wird von oben. Entsprechend sind alle Arten von MTP brauchbar, solange sie bei der interessierenden Wellenlänge nicht störend lumineszieren. Je nach Modell können Emissionsfilter eingebaut sein. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Strahlungsenergie bei fluoreszenz- und chemilumineszenzmessenden Readern werden dort i.a. Sekundärelektronenvervielfacher als Empfänger eingesetzt, bei absorbanzmessenden Readern dagegen Photodioden.

1.3. Zweck der Temperierung von MTP mit Analysengut

Ist in den Reader noch eine Heizung für die in der MTP befindlichen Proben eingebaut, handelt es sich um einen sog. temperierbaren Reader. Diese haben gegenüber nicht-temperierbaren Readern den Vorteil, dieselben Proben bei einstellbaren Temperaturen vermessen zu können. Viele Applikationen brauchen keine Temperierung, da Standards mitgeführt werden, mit deren Hilfe unerwünschter Temperatureinfluß korrigiert wird. Die Eigenschaft Temperierbarkeit erlaubt jedoch entscheidende und wichtige Aussagen über temperaturabhängige Eigenschaften der Proben. Weiterhin entfällt bei einer temperierten Messung der störende Einfluß der infolge Betriebszeit und Umgebungstemperatur veränderlichen Gerätetemperatur. Damit werden Ergebnisse vergleichbar. Gelingt es außerdem, eine schnelle und homogene Temperierung zu realisieren, erschließt sich eine große Anzahl von Applikationen mit temperaturabhängigen Reaktionen. Z.B. können folgende wichtige Applikationen in MTP durchgeführt werden:

- Enzymanalyse, schnelle Enzymaktivitätsbestimmung;
- Verringern der Reaktionsdauer von Enzymimmuntests;
- immunologische Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen, besonders Agglutinationen;
- Durchführung von PCR.

Die für die PCR-Durchführung notwendigen Temperaturen liegen bei bis zu 95°C. Die Temperaturänderungen erfolgen mit Raten von 1...3°C/s. An die Meßunsicherheit der Lösungstemperatur werden schwächere Forderungen als bei der Enzymaktivitätsbestimmung gestellt. Die angegebenen Regelgenauigkeiten für die Lösungstemperatur liegen im Bereich von $\pm 0.2^\circ\text{C}$ bis $\pm 1^\circ\text{C}$ [Müller u.a. 1996]. Es kommt bei der PCR darauf an, eine chemische Reaktion überhaupt auszuführen. Dagegen kommt es bei der Enzymaktivitätsbestimmung darauf an, den Parameter Temperatur möglichst genau einzustellen, um dessen Einfluß aus der Reaktionsgeschwindigkeit herausrechnen zu können.

Trotz aller genannten Applikationen wurde die schnelle homogene Temperierung aus den Geräteoptionen bisher aus verschiedenen Gründen ausgeklammert:

- Es steht keine praktikable technische Lösung bzgl. Aufheizgeschwindigkeit und Homogenität zur Verfügung.
- Die Überprüfung der Homogenität der Temperaturverteilung in der temperierten MTP gestaltet sich aufwendig.

Die schnelle Aufheizung einer wäßrigen Lösung in einer MTP dient dazu, die Temperatur in jedem Well der MTP innerhalb von 1...2 min möglichst schnell auf eine gewünschte Temperatur, hauptsächlich 37°C, zu bringen und dort zu halten. Damit ist es möglich, allgemeine Parameter temperaturabhängiger, in der Hauptsache enzymatischer Reaktionen zu bestimmen. Zur sicheren Bestimmung dieser Parameter müssen die Eigenschaften der Temperiereinheit bekannt sein: Jedes Well soll gleiche Anfangs- und Endtemperatur haben. Die

Endtemperatur darf nicht überschritten werden. Die Wells sollen gleichzeitig erwärmt werden. Der Wärmeeintrag soll eine Messung während des Aufheizens nicht ausschließen. Dazu muß die Temperiereinheit nahe dem Reader angeordnet sein. Die Wärme soll nicht ins Geräteinnere abfließen, um eine Abkühlung der Randwells zu vermeiden. Die MTP muß die Erwärmung ohne Änderung ihrer Eigenschaften überstehen, damit das Geräteumfeld die temperierte MTP weiter verwenden kann. Ihre optischen Eigenschaften Absorbanz und Lumineszenz dürfen sich nicht wesentlich ändern. Die Verdunstung der Lösung verursacht Volumenverlust, Schichtdickenänderung, Abkühlung an der Oberfläche und damit einen Temperaturgradienten im Well. Randwells weisen eine stärkere Verdunstung auf. Über den MTP-Werkstoff findet eine Wärmeleitung statt. Die Homogenität der Temperaturverteilung in der MTP muß gewährleistet sein.

Beispielsweise beruht die Bestimmung der Enzymaktivität auf der Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit. Im hier interessanten Temperaturbereich 0...40°C steigt die Reaktionsgeschwindigkeit auf ungefähr das Doppelte je 10°C Temperaturzunahme [Löffler/Petrides 1998 S.100]. Das sind umgerechnet etwa

$$10\%/^{\circ}\text{C} \quad (1.1).$$

Um eine geforderte Abweichung der berechneten Enzymaktivität von höchstens $\pm 1\%$ infolge Temperaturfehlern zu erreichen, ist eine Meßunsicherheit der Temperatur von $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ notwendig. Manche Autoren fordern eine noch geringere Meßunsicherheit. Die interessierende Enzymaktivität kann günstig aus der Konzentrationsänderung der Ausgangsstoffe oder der Reaktionsprodukte ermittelt werden. Die Konzentrationsänderung wird aus der während der ablaufenden Reaktion gemessenen Absorbanz, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz berechnet.

Der Idealfall des Temperaturverlaufs im Well ist erreicht, wenn die Temperatur im Vergleich zum Reaktionsfortschritt sehr schnell ansteigt. In diesem Fall und bei geeignet gewählten Konzentrationen ist die ermittelte Absorbanz- bzw. Fluoreszenzkurve in Abhängigkeit von der Zeit eine Gerade. Ihr Anstieg ist ein Maß für die Enzymaktivität. Realistisch kann die Welltemperatur nicht springen, so daß die Absorbanz- bzw. Fluoreszenzkurve für die Zeit bis zum Erreichen der gewünschten Welltemperatur keine Gerade ist. Das zur Auswertung zur Verfügung stehende Geradenstück ist entsprechend kürzer. Dauert das Erreichen der Welltemperatur unverhältnismäßig lange, ist es möglich, daß überhaupt kein Geradenstück erscheint. Die Ermittlung der Enzymaktivität ist nur noch numerisch über eine Approximation und nachfolgende Ableitung oder graphisch über ein Näherungsverfahren möglich. Um die Unsicherheiten der letztgenannten Verfahren auszuschließen, wird ein Geradenanstieg zur Auswertung verwendet. Er vermeidet die Bestimmung der Enzymaktivität aus wenigen Meßwerten oder nur einem Meßwert. Damit sind möglichst viele Meßwerte bei der gleichen Temperatur erforderlich. Hieraus folgt die Forderung nach einer möglichst schnellen Auf-

heizung der wäßrigen Lösung. Nach Versuchsende ist die wäßrige Lösung nicht mehr verwendbar. Die Bestimmung der Enzymaktivität bei einer anderen Temperatur geschieht durch Aufheizen neuer wäßriger Lösung.

1.4. Stand der Technik

Entsprechend dem Verwendungszweck der MTP variieren die Merkmale Material, Höhe, Wellquerschnitt, Wellvolumen, Flach- oder Rundboden und geringfügig auch die äußeren Abmessungen. Einzig die Anordnung der 96 Wells in einer Matrix 8 Zeilen à 12 Spalten wurde von allen Herstellern gleich gewählt. Die Schwankungen der anderen o.g. Parameter werden durch die Konstruktion der MTP-Aufnahme oder durch Auswahl eines MTP-Typs in einer Bedienoberfläche toleriert. Die Vorteile dieser Standardisierung spiegeln sich in Form einer umfangreichen MTP-fähigen Geräteumgebung wider.

Wenn die Temperierung der im Well befindlichen Lösung für alle Wellformen realisiert werden soll, kommt nur ein Verfahren in Frage, das auf die Form der MTP und den Wellquerschnitt keine Rücksicht nehmen muß. Aus Gründen der Paßfähigkeit verschiedener MTP und Erzeugung der Wärme unabhängig von der konkret eingesetzten MTP wurde bisher von einschlägigen Herstellern nur Luft als Wärmeübertragungsmedium zusammen mit der Wärmeleitung über den MTP-Werkstoff verwendet. Wärmeübertragende Flüssigkeiten sind aus praktikablen und regelungstechnischen Gründen weniger geeignet, weil ein Temperaturgradient von Well zu Well entsteht, wenn die wärmeübertragende Flüssigkeit nicht senkrecht zur MTP-Oberfläche fließt. Strahlungstemperierende MTP-Reader konnten nicht gefunden werden. Entsprechend sieht das Angebot auf dem Markt aus: Temperierbare Reader benutzen als Wärmeübertragungsmedium durchweg Luft. Die Aufheizzeit von Umgebungstemperatur auf 37°C beträgt 10..20 min, die Meßunsicherheit $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ und die Homogenität über die Fläche der MTP $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$. Der Temperatursensor ist nicht unbedingt in der Nähe der MTP angebracht. Es wird keine Aussage darüber gemacht, nach welcher Zeit die angegebene Homogenität von $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ gilt. Diese Angaben gelten für die Jahre 1997-2001 und wurden auf der Grundlage von Firmenschriften, teilweise aus dem Internet, zusammengestellt.

Einzig die Firma OPALJENA GmbH hat auf der Medizin-Messe medica im November 1998 den Lösungsgedanken MTP im Formschluß mit Heizkörper aus Aluminium gezeigt.

Die konkrete Heizungskonstruktionen kann variieren:

- Reader Typ 1400: Dieser Reader arbeitet als Vertikalphotometer. Über und unter der MTP befindet sich je eine metallische Platte mit je 96 Löchern, integriertem indirekten Widerstandsheizter und Temperatursensor. Die MTP steht mit ihrem Rand auf der unteren Platte. Die obere Platte wirkt zumindest teilweise als eine weiter hinten erklärte Dachheizung. Die

Temperaturen beider Platten können einzeln geregelt werden. Die Erwärmung der Lösung in der MTP passiert mittels Wärmeleitung über die Luft und den MTP-Werkstoff.

- Reader Fluoroskan II: Ein indirekter Widerstandsheizer in Form einer Leiterschleife in der Größe einer MTP befindet sich auf einer metallischen Platte. Es wird nur der Bereich geheizt, in dem die MTP-Seitenwand auf der metallischen Platte aufliegt. Die Erwärmung der Lösung in der MTP erfolgt mittels Wärmeleitung über die Luft und den MTP-Werkstoff: Die Randwells bekommen ihre Wärme über die MTP-Seitenwand. Die mittleren Wells bekommen ihre Wärme von den Randwells.

Diese beiden Lösungen aus der Produktion Anfang der 90-er Jahre regeln die Sensortemperatur auf die Lösungssolltemperatur. Auf die Dynamik des Systems Heizer-Luft-MTP-Lösung wird keine Rücksicht genommen, ebenfalls nicht auf wechselnde Lösungsvolumina. Insgesamt sind die beiden genannten Lösungen eher für den Erhalt der Lösungstemperatur einer bereits anderweitig temperierten MTP geeignet als für eine schnelle Aufheizung des Wellinhaltes.

Hiervon hebt sich die Lösung der Temperieraufgabe im Reader 340 ATTC positiv ab: Unter Berücksichtigung der Starttemperatur der MTP, der gewünschten Meßtemperatur, des Lösungsvolumens, der Raumtemperatur und der aktuellen Heizplattentemperatur wird ein Aufheizprogramm durchgeführt. Die anfängliche Überheizung der Heizplatten auf 65°C trägt zum schnelleren Erreichen der gewünschten Meßtemperatur bei. Die Aufteilung der Heizung auf vier einzeln geregelte Heizplatten hilft, Randeffekte zu vermeiden [o.V. Bedienungsanleitung für Reader 340 ATTC].

Eine andere Lösung wird im Reader SpectraMax Gemini realisiert: Eine Temperierkammer ist nach außen mit Kunststoff thermisch teilweise isoliert. Innen auf dem Boden befindet sich eine Heizleiterschleife größer als die MTP. Der Deckel der Temperierkammer wird ebenfalls beheizt. Beide Heizungen werden einzeln auf vom Sollwert der Lösungstemperatur abweichende Temperaturen geregelt. Zusätzlich wird ein schwacher Luftstrom durch die Temperierkammer geleitet, der durch eine dritte Heizung erwärmt wird. Die Solltemperaturen der drei Heizleistungsanteile sollen in der MTP die gewünschte Lösungstemperatur sichern. Nach Herstellerangaben ist dieses System zum Erhalt der Lösungstemperatur in einer bereits woanders temperierten MTP geeignet, nicht jedoch zum Aufheizen der Lösung in einer MTP (Abb. 1.1).

Als Wärmequelle werden durchweg ohmsche Widerstände in Form von Leiterbahnen o.ä. verwendet. Lediglich die Firma Appligene Oncor verwendet in ihren PCR-Geräten Crocodile II und Crocodile III eine Halogenlampe als Wärmequelle [Müller u.a. 1996].

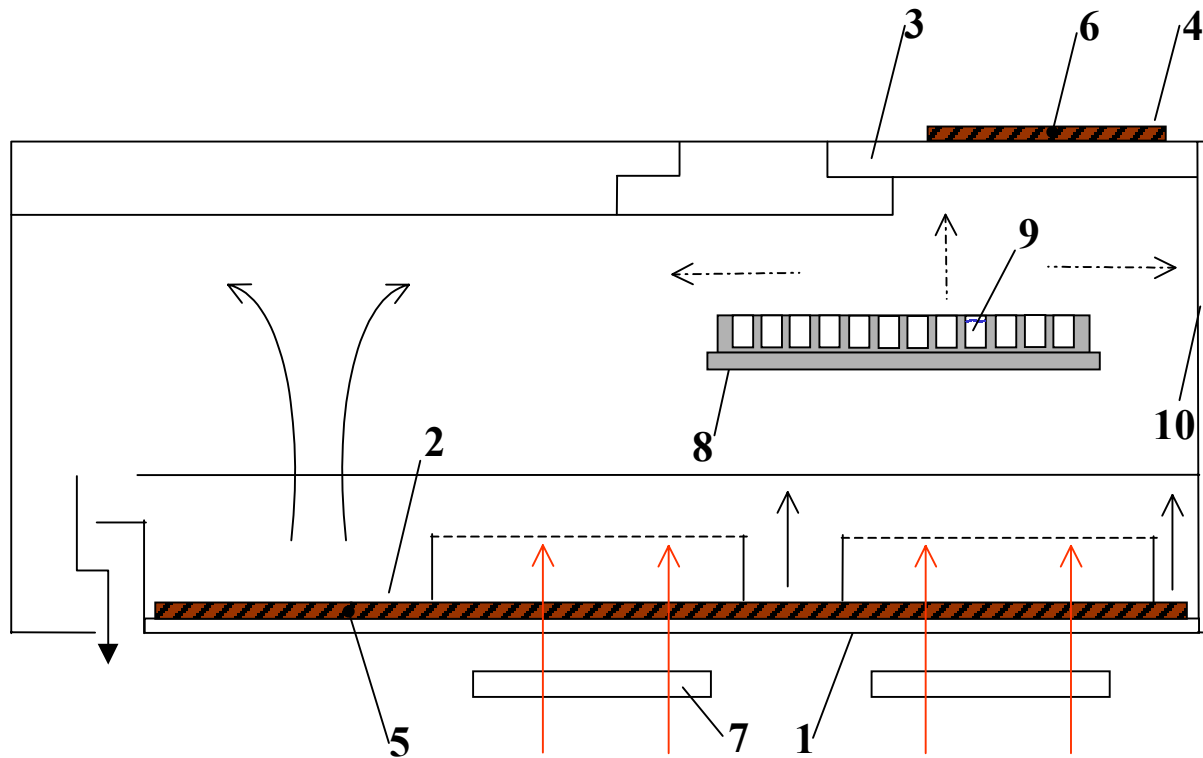


Abb. 1.1: Wärmeflüsse und Verdunstung bei der Erwärmung der Wellinhalte einer MTP und Skizze der Inkubationskammer des temperierbaren fluoreszenzmessenden Readers SpectraMax Gemini; 1-beheizte metallische Bodenplatte, 2-Heizleiterschleife Bodenplatte, 3-beheizte metallische Deckplatte, 4-Heizleiterschleife Deckplatte, 5-Tempersensord Bodenplatte, 6-Tempersensord Deckplatte, 7-Heizer zur Erwärmung der durchströmenden Warmluft, 8-MTP, 9-Wellinhalte der MTP, 10-Klappe zum Verschließen des Schachtes;
durchgehende Pfeile: Wärmefluß (Leitung, Konvektion), Strich-Punkt-Pfeile: Verdunstung
Seitenwände, Transportmechanismus, Meßeinrichtungen und thermische Isolierung nicht gezeichnet;
MTP-Werkstoffe: PS 1.2 mm dick, PP 1.0 mm dick

Die für die temperierte kinetische Bestimmung von Enzymaktivitäten abgeleiteten notwendigen Parameter werden von bislang verkauften Systemen nicht erreicht. Die bisher verwendeten technischen Lösungen zum Temperieren von MTP nutzen die Übertragung von Wärme, die in Heizelementen erzeugt wird, durch Leitung oder Konvektion auf das Analysengut, häufig mittels Luft. Zwar werden von fast allen Readerherstellern Geräte mit entweder eingebauten oder beistellbaren Temperiereinheiten angeboten, jedoch finden diese in der Praxis kaum Einsatz. Für viele Anwendungen sind inakzeptabel lange Anheizzeiten bis zum Erreichen der Solltemperatur notwendig. Außerdem werden erhebliche Inhomogenitäten über die Fläche der MTP beim Erwärmen des darin befindlichen Analysengutes beobachtet. Zur Verringerung von Inhomogenitäten der Temperaturverteilung, insbesondere in den Randzonen der MTP, wird mit der DE 32 14 317 [Dopatka 1982] eine Lösung vorgeschlagen, welche die umlaufenden gespritzten Ränder der MTP und damit die Wärmeleitung vom MTP-Rand in die Randwells unterbricht, bei der nach jeder zweiten Reihe Wells ein großflächiger Steg zur gleichmäßigen Verteilung der Wärme in die benachbarten Wells angeordnet ist und die so die bekannten Randeffekte bei der Temperierung mit Luft in Inkubatoren vermeidet.

Die Lösung JP 72 60 648 [Hiroyuki 1995] beschreibt die schnelle und gleichmäßige Erwärmung durch das getrennte Regeln der Temperaturen im Randbereich und im inneren Bereich einer MTP. Die Erwärmung der Lösung geschieht durch Wärmeleitung über den MTP-

Rand und über die Luft. Die inakzeptabel lange Zeit bis zum Erreichen der Solltemperatur bleibt bei beiden Lösungen unberührt.

In der DE 34 41 179 [Nittel 1984] wird ein Wärmeübertragungskörper vorgeschlagen, der auf einer Temperatureinstellplatte gleitend angeordnet ist und mittels Wärmeleitung die Wärme in das Innere des flüssigen Analysengutes der MTP transportiert. Die Temperatureinstellplatte selbst wird mittels Durchpumpen von Wasser auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die relativ langen Wege des Wärmeflusses und die mehreren Wärmeübergangszonen von der Temperatureinstellplatte mit flächigem Wärmekontakt über den Temperaturübertragungskörper und die Kunststoffwandung des Einzelgefäßes bis zum Analysengut im Innern der Einzelgefäße der MTP lassen das Verfahren als wenig praktikabel erscheinen.

In der DE 39 41 168 [Verbruggen 1989] wird ein temperierter Wärmeübertragungskörper aus Keramik vorgeschlagen. Dieser ist paßgenau zur MTP ausgeführt. Die Heizer bestehen aus ohmschen Widerständen. Dadurch ist eine Lösung entstanden, die zwar prinzipiell für viele MTP-Anwendungen einsatzfähig ist, jedoch grundsätzlich die gleichen Temperierungsprobleme mit den bereits beschriebenen langen Wegen des Wärmeflusses und mit den Wärmeübergangszonen bis hin zum Analysengut in den Einzelgefäßen aufweist.

Darüber hinaus ist die Lösung DE 42 17 868 [Horn u.a. 1992] bekannt, welche die Geschwindigkeit des Wärmeüberganges und die Temperaturhomogenität in der MTP verbessert, indem ein kontrolliert temperierbarer metallischer Körper, der Temperierkörper, mit bestimmten Heizstrukturen zur formschlüssigen Aufnahme mehrerer Nunc-strips Verwendung findet. Die Heizstrukturen sind zwischen den Wellreihen befindliche Leiterbahnen. In der DE 195 01 298 [Schilling u.a. 1995] ist eine Vorrichtung zum formschlüssigen Einpressen der Einzelgefäße in diesen Temperierkörper vorgesehen, wodurch eine gute Wärmeübertragung garantiert wird. Von Nachteil ist das Erfordernis eines relativ kompliziert herzustellenden und damit kostenaufwendigen Temperierkörpers, wobei die Anwendung auf eine spezielle Ausführung von MTP in Kombination mit dem dazugehörigen Temperierkörper mit der bestimmten Heizstruktur beschränkt ist. Außerdem sind auch bei dieser Lösung nach wie vor die besagten langen Wege des Wärmeflusses von Metall über Kunststoff bis zum Analysengut gegeben.

Andere Vorschläge, wie DE 39 38 565 [Gross u.a. 1989], US 53 07 144 [Hiroshi u.a. 1994], US 56 81 492 [Van Praet 1996] und WO 91/06369 [Puchegger u.a. 1990] beruhen auf der Verwendung von Luft als wärmeübertragendem Medium mit und ohne Gebläse unter Verwendung von zusätzlichen Hilfsmitteln wie Wärmeleitung von einer temperierten metallischen Platte in die Wellböden und perforierten MTP-Oberflächen zum Abströmen temperierter Luft. Diese Lösungen führen ebenfalls durchweg zu inakzeptabel langen Aufheizzeiten.

Der Vorschlag JP 11 80 435 [Yamamoto u.a. 1988] beschreibt die Wärmeleitung von einer von unten und einer von oben an die MTP gepreßten beheizten Platte in die Lösung. Luftdichter Abschluß oben verhindert Verdunstung. Die gleiche Temperatur der oberen und der unteren Platte verhindert vertikale Temperaturgradienten. Hier kann wegen kleiner Fläche in Richtung der Wärmeleitung keine geringe Aufheizzeit erreicht werden.

Die Erfindung US 54 59 300 [Kasman 1995] schlägt eine elastische wärmeleitende Platte vor, die von unten an die MTP gedrückt wird. Dieser Vorschlag umgeht zwar die Luft als wärmeübertragendes Medium, bringt die Wärme aber eben nur über die Wellböden in die Lösung, was ebenfalls zu große Aufheizzeiten nach sich zieht. Randeffekte werden durch Verhinderung des Kontaktes des MTP-Randes zur elastischen wärmeleitende Platte vermieden.

Alle Lösungen, die die Wärme über den Wellboden leiten, verbieten Absorbanzmessungen während des Heizens.

Weiterhin kann Wasser vorteilhaft in einem Umlaufthermostat als wärmeübertragendes Medium verwendet werden, wie in EP 03 39 710 [Mansveld Beck u.a. 1989] und US 55 08 197 [Hansen u.a. 1996], letzteres für PCR-Durchführung, beschrieben. Hier kann die nötige Anheizzeit gegenüber Luft drastisch verringert werden, jedoch ist man auf die Verwendung von MTP mit frei zugänglichen Wellmantelflächen angewiesen, damit die Erwärmung nicht nur über den Wellboden passiert. Es ist die gleiche Umspülung aller Wells nötig. Während des Heizens können keine Absorbanzmessungen durchgeführt werden.

In DE 197 39 120 [Horn u.a. 1997] wird die Applikation einer temperierten MTP zur Bestimmung der temperaturabhängigen Antioxidanzkapazität von Proben beschrieben. Der Vorteil gegenüber bisherigen Verfahren besteht in der gleichzeitig durchführbaren gleichmäßigen Temperierung verschiedener Reaktionsgemische in einer MTP, was Zeitersparnis und gleiche Randbedingungen für alle Reaktionsgemische bedeutet.

Die Temperatur der in den Wells befindlichen Lösung wird mit Hilfe sog. optischer Thermometer bestimmt. Gründe für die Verwendung optischer Thermometer sowie deren Funktionsweise werden im Kapitel 2 „Temperaturmessung im Well“ erläutert. Die folgenden beiden Erfindungen beschreiben zwei für MTP geeignete optische Thermometer. Die Patentschrift DE 41 30 584 [Schilling u.a. 1991] legt ein optisches Thermometer offen, welches temperaturabhängige Absorbanzen zur Bestimmung der Temperaturen in den Wells einer MTP auswertet. Ein weiteres in AZ 199 28 056.8 [Horn u.a. 1999/2] beschriebenes optisches Thermometer löst die gleiche Aufgabe mit temperaturabhängigen Fluoreszenzen.

1.5. Aufgabenstellung

Es ist ein Heizverfahren für befüllte MTP zu entwickeln, das den in der Einleitung abgeleiteten Forderungen Anheizzeit 1...2 min vorzugsweise von Raumtemperatur auf 37°C sowie Homogenität und Meßunsicherheit der Lösungstemperatur von je 0.1°C über die MTP genügt. Die verschiedenen theoretischen Möglichkeiten des Wärmeeintrags in die Lösung sind zu untersuchen. Von den davon praktisch anwendbaren Verfahren sind die Randbedingungen der Einsatzmöglichkeiten festzustellen. Der Einfluß der Verdunstung auf das Lösungsvolumen ist zu untersuchen. Die mit den praktisch anwendbaren Verfahren erreichte Homogenität der Temperaturverteilung ist zu diskutieren. Es sind verschiedene Energiequellen zu untersuchen, wobei bei der Auswahl einer technischen Lösung auch noch folgende Punkte berücksichtigt werden müssen:

- Das Heizverfahren soll sich auf möglichst viele verschiedene MTP-Typen anwenden lassen.
- Das Heizverfahren muß auch bei einer auf die MTP aufgeklebten Folie funktionieren.
- Das Analysengut muß während des Aufheizens möglichst geschont werden, d.h., es darf durch die Erwärmung nicht geschädigt werden. Die Schädigung tritt meist durch Hitzedenaturierung ein [Löffler/Petrides 1998 S.100].
- Das Heizverfahren soll Messungen während der Aufheizphase gestatten.
- Die Heizung soll möglichst schnell nach dem Einschalten die benötigte Energie liefern, um eine unnötige Wärmeabgabe in den Reader oder in die Umgebung zu vermeiden und um nicht unnötig viel Energie selbst zu speichern, d.h., sie soll eine niedrige Wärmekapazität haben.
- Der Preis der Temperiereinheit soll nicht mehr als ca. 10% des Verkaufspreises eines Readers betragen.

Die Methode der Messung der Lösungstemperatur in jedem Well ist zu beschreiben. Die Eignung des zur Messung der Lösungstemperatur verwendeten optischen Thermometers auf der Basis des TRIS-Kresolrot-Systems ist in einem erweiterten Temperaturbereich von 5...50°C zu prüfen. Die Ausweitung der Funktion eines optischen Thermometers auf einen fluoreszenzmessenden Reader ist zu untersuchen.

Es ist eine Möglichkeit zu schaffen, die von verschiedenen Readern gewonnenen Daten vergleichbar auszuwerten.

2. Temperaturmessung im Well

Um Untersuchungen zur Temperierung befüllter MTP durchführen zu können, muß die Temperatur in allen Wells gemessen werden. Das kann mit Hilfe kleiner konventioneller elektrischer Sensoren wie Thermistoren, Thermoelementen und Platinwiderständen geschehen. Nachteilig sind die zusätzliche Wärmeableitung über die Sensorzuleitungen und die Unpraktikabilität dieser Sensoren, sobald in allen Wells die Temperatur möglichst gleichzeitig gemessen werden soll. Somit bieten sich chemische Sensoren, sog. optische Thermometer, zur Temperaturmessung an. Deren Vorteile sind direkte Messung der Temperatur und zumindest bei absorbanzmessenden Readern Integration über die Flüssigkeitshöhe. Da sowohl das optische Thermometer als auch eine zu untersuchende Probe in Form einer wäßrigen Lösung vorliegen, kann für beide das gleiche Verhalten bzgl. der Temperierung vorausgesetzt werden. Damit ist das optische Thermometer im Gegensatz zu konventionellen Sensoren rückwirkungsfrei. Die Abhängigkeit der Meßwerte des optischen Thermometers von der Temperatur muß mittels einer Kalibrierprozedur ermittelt werden. Deren Ergebnisse bestimmen die Kalibrierkurve. Die Zuordnung der gemessenen temperaturabhängigen Absorbanz, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz zur Lösungstemperatur geschieht mit Hilfe eines elektronischen Referenzthermometers mit bekannter Fehlergrenze, dessen Sensor sich während der Kalibrierprozedur in einem Well befindet.

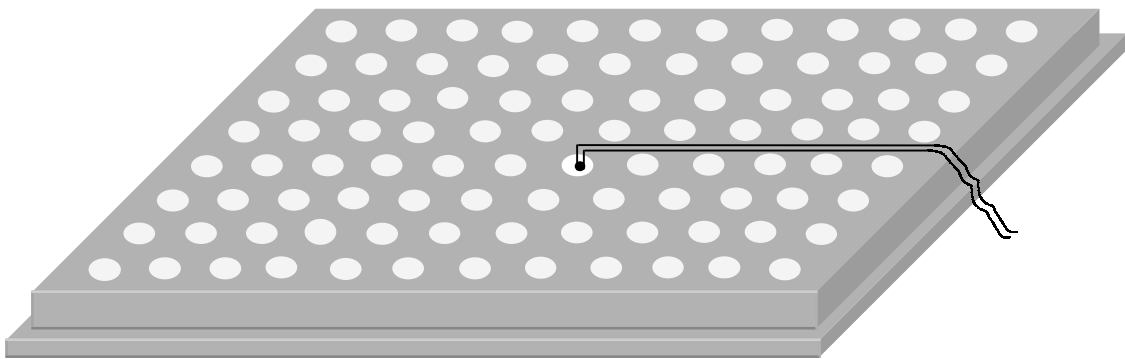


Abb. 2.1: schematische Darstellung einer MTP mit 96 Wells, Grundfläche 125·85 mm², Well-Raster 9 mm, mit Temperatursensor im Well E7

Abb. 2.1 zeigt den Sensor eines Referenzthermometers in einer MTP. Für diese Kalibrierprozedur sowie für die spätere Auswertung der Meßwerte des optischen Thermometers einschließlich deren Umrechnung in Temperaturen mit Hilfe der genannten Kalibrierkurve ist eine spezielle Software erforderlich. Zur Durchführung der Temperaturmessung muß die Lösung, die das optische Thermometer darstellt, hergestellt und eine MTP damit befüllt werden. Damit wird eine rückwirkungsfreie Temperaturbestimmung in allen Wells realisiert, was Voraussetzung für eine korrekte Messung der Temperaturverteilung ist. Aus diesem Grund und unter Betrachtung des Preises für ein Meßsystem mit 96 konventionellen Sensoren ist das z.Zt. am besten einsetzbare Thermometer ein optisches.

2.1. Funktionsweise des optischen Thermometers

Das optische Thermometer hat die Aufgabe, die Temperatur der in allen Wells befindlichen Lösung in eine vom Reader meßbare Größe umzuwandeln. Die Wirkungsweise der Temperaturmessung in allen Wells einer MTP mit Hilfe eines optischen Thermometers ist in Abb. 2.2 dargestellt.

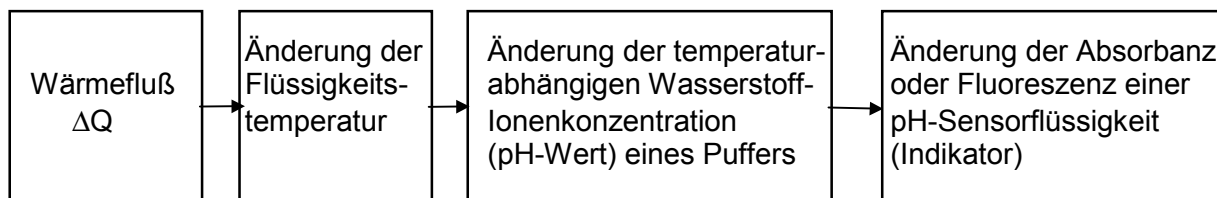


Abb. 2.2: Wirkungsweise des optischen Thermometers

Die Lösung des optischen Thermometers besteht aus zwei Komponenten: einem Puffer und einem Indikator. Die Lösungstemperatur beeinflusst den pH-Wert des Puffers. Ein häufig verwendeter Puffer ist Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Abk. TRIS. Sein pH-Wert sinkt mit steigender Temperatur. Der Indikator setzt die Änderung des pH-Wertes in die Änderung der vom Reader meßbaren Größe Absorbanz oder Fluoreszenz um. Der Indikator wird so ausgewählt, daß diese Änderungen möglichst groß sind und im sichtbaren oder nahen UV-Bereich stattfinden. Es sind Indikatoren bekannt, deren wellenlängenabhängige Absorbanz bzw. Fluoreszenz Extremwerte durchlaufen. Deren Höhe ist temperaturabhängig. Die größte Meßempfindlichkeit ergibt sich bei Messung mit der Wellenlänge des Extremums. Hat man Indikatoren mit zwei bzgl. der Temperatur gegenläufigen Extrema zur Verfügung, gestattet eine Messung bei den entsprechenden Wellenlängen zum einen eine weitere Erhöhung der Meßempfindlichkeit und zum anderen die Elimination des Schichtdickenfehlers [Schilling u.a. 1993/1]. Für die Messung im absorbanzmessenden Reader wird der Indikator o-Kresol-sulfonphtalein, auch als Kresolrot bezeichnet, häufig verwendet, und für die Messung im fluoreszenzmessenden Reader hat sich 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure Natriumsalz, Abk. HPTS, als günstig erwiesen.

Die Änderungen der Absorbanz, Fluoreszenz und Chemilumineszenz bzw. des pH-Wertes sind reversibel und folgen dem pH-Wert bzw. der Temperatur nahezu trägheitslos. Die Lösungen sind leicht herzustellen. Die Lösung für den absorbanzmessenden Reader ist bei +5°C mehrere Monate haltbar [Schilling u.a. 1993/1], unter Zusatz von Natriumazid mehrere Wochen bei Raumtemperatur [Schilling u.a. 1993/2].

Ein gleichzeitiger Ablauf der chemischen Reaktion und der Temperaturmessung in allen Wells durch ein optisches Thermometer ist i.a. ausgeschlossen, weil sich die nötigen Substanzen für beide Reaktionen gleichzeitig im Well befinden müßten. Damit kann eine gegenseitige Einflußnahme beider Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

2.1.1. absorbanzmessender Reader

Der absorbanzmessende Reader Typ 1400 besitzt eine 8-Kanal-Optik. Jeder Optikkanal sieht ein Well einer MTP-Spalte. Die Absorbanzen der 8 Wells einer MTP-Spalte werden gleichzeitig gemessen. Während der Messung wird die MTP in Zeilenrichtung unter der Optik verfahren, so daß jeder Optikkanal nacheinander 12 Wells sieht. Die Messung erfolgt bei einer einzigen und für alle Wells gleichen Wellenlänge. Erst bei einer zweiten Messung kann die Wellenlänge geändert werden. Der Reader besitzt einen integrierten Schüttler.

Als Puffer wird TRIS und als Indikator wird Kresolrot verwendet. Kresolrot hat zwei gegenläufige Maxima im Verlauf seiner wellenlängenabhängigen Absorbanz: eines bei $\lambda=573$ nm mit $dA_{573\text{ nm}}/dpH > 0$ und ein weiteres bei $\lambda=435$ nm mit $dA_{435\text{ nm}}/dpH < 0$. Oberhalb von $\lambda=620$ nm ist eine geringe, vom pH-Wert unabhängige Absorbanz meßbar. Die nächstliegenden verfügbaren Filterwellenlängen im absorbanzmessenden Reader Typ 1400 sind 570 nm und 405 nm. Die Verwendung dieser dicht neben den Maxima liegenden Wellenlängen verringert die Meßempfindlichkeit nicht wesentlich. Die Absorbanzfunktion S wird zu

$$S = \frac{A_{570\text{ nm}}}{A_{405\text{ nm}}} \quad (2.1)$$

oder zu

$$S = \frac{A_{570\text{ nm}} - A_{620\text{ nm}}}{A_{405\text{ nm}} - A_{620\text{ nm}}} \quad (2.2)$$

gewählt. Mit Gleichung (2.1) werden Fehler durch von Well zu Well verschiedene Schichtdicken und Konzentrationen eliminiert. Mit Gleichung (2.2) werden zusätzlich zu den zu Gleichung (2.1) genannten Fehlern von Well zu Well verschiedene Absorbanzen der leeren MTP eliminiert [Schilling u.a. 1993/1, Schilling u.a. 1993/2].

Die für die Temperaturbestimmung im TRIS-Kresolrot-System verwendete Gleichung für die Kalibrierkurvenapproximation lautet nach [Schilling 1992] implizit für ϑ :

$$\ln S = n + m \cdot \vartheta^k \quad (2.3).$$

S ist die Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.1) bzw. nach Gleichung (2.2); $\ln S$ ist ihr natürlicher Logarithmus. ϑ ist die zum Zeitpunkt der Messung im Well herrschende Temperatur in Grad Celsius. Der Exponent k in Gleichung (2.3) realisiert einen schwach gekrümmten Verlauf der Kalibrierkurvenapproximation. Die Parameter n,m,k sind zu bestimmen. Nur bei Anwendung von Gleichung (2.2) und dann nur bei konstanten Wellbodenabsorbanzen $A_{\text{MTP}, 570\text{ nm}} = A_{\text{MTP}, 620\text{ nm}}$ und $A_{\text{MTP}, 405\text{ nm}} = A_{\text{MTP}, 620\text{ nm}}$ ist das Absorbanzverhältnis S und damit die nach Gleichung (2.3) berechnete Temperatur ϑ unabhängig vom Lösungsvolumen.

2.1.2. fluoreszenzmessender Reader

Der fluoreszenzmessende Reader Fluoroskan II besitzt eine 1-Kanal-Optik, die genau ein Well sieht. Während der Messung wird die MTP mäanderförmig unter der Optik verfahren, so daß der Optikkanal nacheinander alle 96 Wells sieht. Die Messung erfolgt bei einer einzigen und für alle Wells gleichen Wellenlängenkombination. Erst bei einer zweiten Messung kann diese Kombination geändert werden.

Als Puffer wird TRIS und als Indikator wird HPTS verwendet. HPTS hat ähnlich Kresolrot ebenfalls zwei gegenläufige Maxima im Verlauf seines wellenlängenabhängigen Anregungspektrums: eines bei $\lambda=455\text{ nm}$ mit $dF_{455\text{ nm}}/dpH > 0$ und ein weiteres bei $\lambda=403\text{ nm}$ mit $dF_{403\text{ nm}}/dpH < 0$. Die Emission wurde bei $\lambda=520\text{ nm}$ gemessen [Wolfbeis u.a. 1983 Fig. 4]. Die nächstliegenden verfügbaren Filterwellenlängen im fluoreszenzmessenden Reader Fluoroskan II sind 450 nm und 405 nm für die Anregung sowie 538 nm für die Emission. Sie liegen hinreichend dicht an den genannten Wellenlängen, so daß praktisch keine Verringerung der Meßempfindlichkeit auftritt.

Den Verlauf der temperaturabhängigen Fluoreszenzen zeigt Abb. 2.3. Bei der Division beider Meßwerte

$$p = \frac{F_{405\text{ nm}}}{F_{450\text{ nm}}} \quad (2.4)$$

ergeben sich zwei Vorteile:

- Der VK über die MTP ist kleiner als der VK der Meßwerte $F_{405\text{ nm}}$ und $F_{450\text{ nm}}$ alleine, weil wellbezogene wellenlängenunabhängige Unterschiede wie Füllstands- und Konzentrationsfehler wegen gleichsinnigem Einfluß herausfallen. Bei ein- und derselben Messung betrug der VK des Quotienten p $0.41\ldots 0.54\%$ und der VK der Fluoreszenzmeßwerte alleine $2.8\ldots 3\%$. Der VK des Quotienten p wird berechnet, indem zunächst 96 Quotienten nach Gleichung (2.4) gebildet werden und danach die empirische Standardabweichung s der 96 Quotienten durch deren Mittelwert dividiert und mit 100% multipliziert wird.
- Die Meßempfindlichkeit steigt, weil die Temperaturkoeffizienten der Fluoreszenzmeßwerte verschiedene Vorzeichen haben.

Die Anwendung eines Differenzenquotienten ähnlich Gleichung (2.2) ist nicht sinnvoll, weil die Fluoreszenzmeßwerte wegen Proportionalität zum Anregungslicht keine additiven Konstanten enthalten.

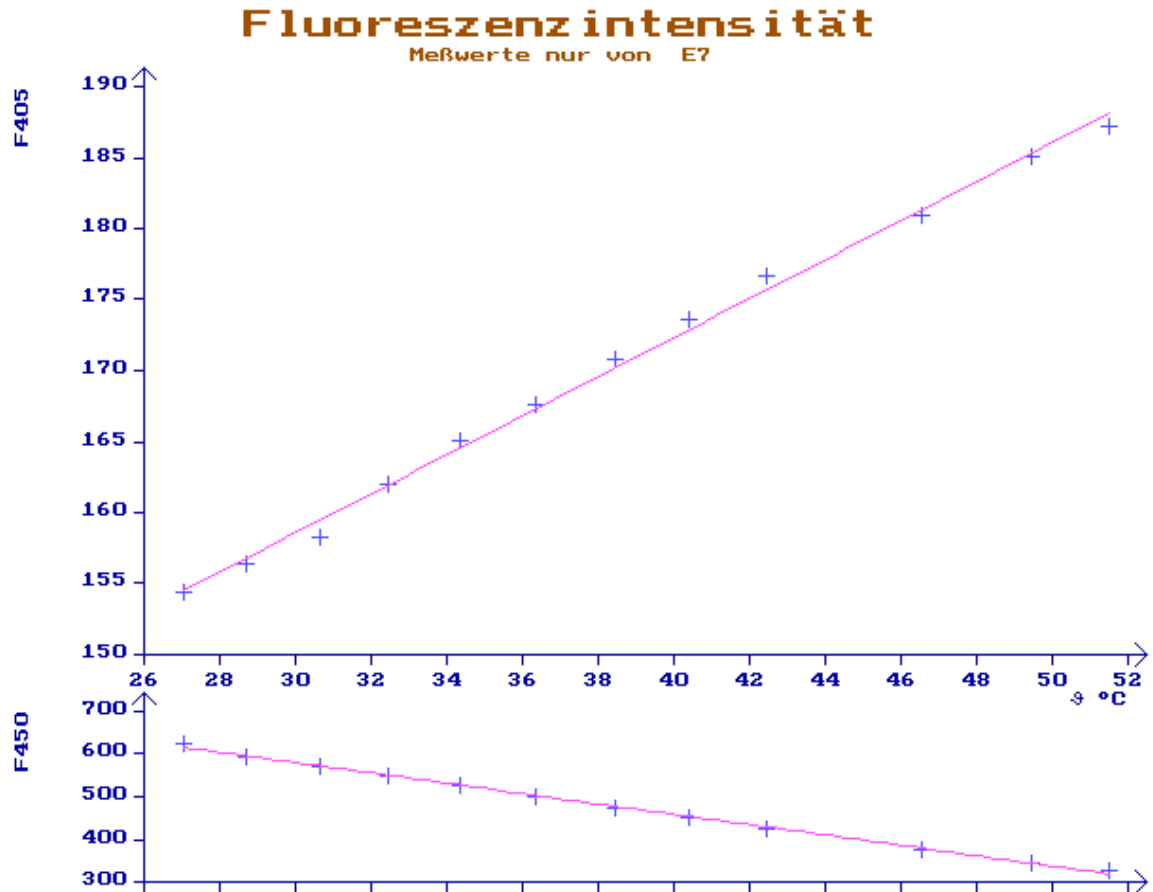


Abb. 2.3: Verlauf der Fluoreszenzmeßwerte am Fluoroskan II in Abhängigkeit von der Temperatur; oben: Anregung mit 405 nm (F405), unten: Anregung mit 450 nm (F450), Emission jeweils bei 538 nm. Zusätzlich sind die Regressionsgeraden eingezeichnet. Sie bestätigen gute Linearität (oben: $R=0.9983$, unten: $R=-0.9991$). Die Dachheizung wurde 3°C wärmer als der Heizkörper eingestellt. Die Referenztemperaturen wurden mit Gleichung (2.6) auf Welltemperaturen umgerechnet. F405, F450 in dieser Abbildung sind identisch $F_{405\text{ nm}}$, $F_{450\text{ nm}}$ im Text.

Wie Abb. 2.3 zeigt, hängen die Fluoreszenzintensitäten praktisch linear von der Temperatur ab. Dies ist auf zwei einzelne gut lineare Abhängigkeiten zurückzuführen: die Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes von der Temperatur und die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Puffer-pH-Wert, s.a. Abb. 2.2. Erstere ist sehr gut linear [Perrin 1965, S. 34, No. 144]. Die approximierende Gerade hat $\text{dpH}/\text{d}\vartheta = -0.0281\text{pH}/^{\circ}\text{C}$ mit $R=0.9984$ im Bereich $0\dots 50^{\circ}\text{C}$. Die zweite Abhängigkeit ist im Bereich pH 7...8 ebenfalls gut linear [Wolfbeis u.a. 1983 Fig. 3, dort für die Wellenlängen 403, 454 und 520 nm]. Beides zusammen erklärt die hohen Regressionskoeffizienten R aus Abb 2.3 und rechtfertigt damit den linearen Ansatz $F_{405\text{ nm}} = c_1 + c_2 \cdot \vartheta$ und $F_{450\text{ nm}} = c_3 + c_4 \cdot \vartheta$. Damit führt die Bestimmung der Lösungstemperatur ϑ in einem Well durch Einsetzen dieser beiden Gleichungen in Gleichung (2.4) und nachfolgendem Auflösen nach ϑ auf die Gleichung

$$\vartheta = \frac{a + b \cdot p}{1 + c \cdot p} \quad (2.5)$$

mit p nach Gleichung (2.4), wobei die Parameter a, b, c von $c_1\dots c_4$ abhängen und noch berechnet werden müssen.

2.2. Ermittlung der Kalibrierkurven

Die Ermittlung der Kalibrierkurve zur Bestimmung der Lösungstemperatur besteht grundsätzlich aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten:

- Zuordnung der Absorbanz- bzw. Fluoreszenzmeßwerte eines Wells zur gemessenen Lösungstemperatur in diesem Well: Für jede eingestellte Lösungstemperatur entsteht ein Wertepaar $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ mit S nach Gleichung (2.1) oder Gleichung (2.2) bzw. $(\vartheta_i, p_i(\vartheta_i))$ mit p nach Gleichung (2.4).
- Ermittlung eines Parametersatzes, der eine gegebene Funktion maximal gut auf die Wertepaare $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ bzw. $(\vartheta_i, p_i(\vartheta_i))$ legt. Dieser Parametersatz wird zusammen mit der gegebenen Funktion bei nachfolgenden Messungen zur Temperaturberechnung der Lösung im Well benutzt.

Die Kalibrierkurve verbindet die Meßwerte des optischen Thermometers mit der Lösungstemperatur und wird an demjenigen Reader aufgenommen, an dem später gemessen werden soll. Für fluoreszenz- und chemilumineszenzmessende Reader ist diese Verfahrensweise wegen der Abhängigkeit des Meßergebnisses von der Entfernung und Empfindlichkeit des Detektors und vom Öffnungswinkel der Detektoroptik notwendig. Absorbanzmessende Reader weisen diese Notwendigkeit dagegen nicht auf. Die Absorbanz einer Lösung hängt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz nur von der durchstrahlten Schichtdicke der Lösung, der Konzentration des absorbanzverursachenden Stoffes und dessen wellenlängenabhängigem Extinktionskoeffizienten ab. Die Absorbanz der Lösung könnte zwar in einem externen Meßaufbau bestimmt werden, jedoch werden dann folgende Fehlereinflüsse nicht berücksichtigt:

- Meniskus,
- Absorbanz der Wellböden,
- unterschiedliche spektrale Durchlaßkurven von externem Meßaufbau und Reader,
- systematischer Fehler der Absorbanzmessungen.

Die Welltemperatur kann mit einem geeigneten Thermometer, dem Referenzthermometer, gemessen werden, dessen Fehlergrenze bekannt sein muß.

2.2.1. absorbanzmessender Reader

Die Lösung für die Temperaturmessung im absorbanzmessenden Reader besteht aus 60 mg Kresolrot + 4 mg Natriumazid in 2 l 0.1M TRIS pH=8.03 bei 20.9°C entsprechend 78 µM Kresolrot in 0.1M TRIS. Sie wird am Tag der Kalibrierung zur Entgasung für 15 min in ein Ultraschallbad gebracht, um Blasenbildung im Well zu vermeiden. In den Heizkörper werden unbenutzte Nunc-strips eingesetzt. Danach werden mit dem Pipettierroboter in jedes Well der Nunc-strips 250 µl TRIS-Kresolrot-Lösung eingefüllt. In einem der 96 Wells wird der Sensor des Referenzthermometers untergebracht. Dazu wählt man vorzugsweise eins der

mittleren Wells aus, z.B. E7. Der Heizkörper des Readers wird auf eine vorgebbare Temperatur erwärmt. Die Lösungstemperatur folgt ihr. Eine in den Reader eingebaute Oberheizung wird mit Hilfe einer eigenen Regelung geringfügig wärmer als der Heizkörper gehalten. Nach Abschluß und zur Unterstützung der Ausgleichsvorgänge wird die Lösung mit dem integrierten Schüttler zunächst geschüttelt. Dann werden die Lösungstemperatur im Referenzwell mit Hilfe des Referenzthermometers und die dazugehörige Absorbanz mit Hilfe des Readers einmal je Wellenlänge ermittelt. Danach wird die nächste Heizkörpertemperatur angefahren. Die Abstände der Temperaturen sollten nicht zu groß sein. Als günstig haben sich 2 bis 3°C erwiesen. Nach Aufnahme aller Wertepaare $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ können die Parameter n, m, k aus Gleichung (2.3) mit Hilfe des Algorithmus nach [Cumme 1992] ermittelt werden. Ein Bild der entstehenden Kalibrierkurve wird später gezeigt. Die Parameter n, m, k müssen gespeichert werden. Nachfolgende Messungen müssen dieselbe Lösung und dasselbe Lösungsvolumen verwenden, weil die Einstellung des Puffer-pH-Wertes bei einer gegebenen Temperatur nicht exakt reproduzierbar ist. Bei Verwendung einer neu angesetzten Lösung müssen die Parameter n, m, k neu bestimmt werden.

2.2.2. fluoreszenzmessender Reader

Die Lösung für die Temperaturmessung im fluoreszenzmessenden Reader besteht aus 2µM HPTS in 0.1M TRIS pH=7.51 bei 22.5°C. Sie wird zur Entgasung am Tag der Kalibrierung ebenfalls für 15 min in ein Ultraschallbad gebracht. In den für Corning-Costar-MTP Thermowell 6510 formschlüssig gefertigten Heizkörper wird eine derartige neue MTP eingesetzt. Danach werden mit dem Pipettierroboter in jedes Well 130 µl TRIS-HPTS-Lösung eingebracht. Die jetzt folgenden Schritte laufen praktisch identisch mit der Aufnahme der Kalibrierkurve am absorbanzmessenden Reader ab: Erwärmen des Heizkörpers und der Oberheizung, Abwarten der Ausgleichsvorgänge, Ermittlung der Heizkörpertemperatur und der dazugehörigen Fluoreszenz einmal je Wellenlänge, Anfahren der nächsten Heizkörpertemperatur, Ermittlung der Parameter a, b, c aus Gleichung (2.5) mit Hilfe des Verfahrens [Cumme 1998], Speicherung der Parameter a, b, c . Nachfolgende Messungen müssen wieder dieselbe TRIS-HPTS-Lösung und das gleiche Lösungsvolumen verwenden. Bei Verwendung einer neu angesetzten TRIS-HPTS-Lösung müssen die Parameter a, b, c ebenfalls neu bestimmt werden.

Das direkte Messen der Lösungstemperatur mit dem Sensor des elektronischen Thermometers DTMS 5...60°C führt zu stark verfälschten Fluoreszenzmeßwerten, da sich die Lösungsoberfläche und der Abstand der Lösungsoberfläche zum Detektor beim Eintauchen des Sensors ändern. Deshalb werden zum Kalibrieren die Temperaturen des Heizkörpers ϑ_K mittels eines vorher gemessenen Zusammenhangs in Lösungstemperaturen umgerechnet. Die so berechneten Lösungstemperaturen ϑ_L werden der Berechnung der Parameter a, b, c

der Kalibrierkurve zugrunde gelegt. Die Meßwerte wurden ermittelt, indem ohne Rücksicht auf die Fluoreszenzmeßwerte bei verschiedenen Temperaturen die Heizkörper- und die Lösungstemperatur gemessen wurden. Es entsteht eine Meßwertschar, die sich gut durch eine Gerade beschreiben läßt.

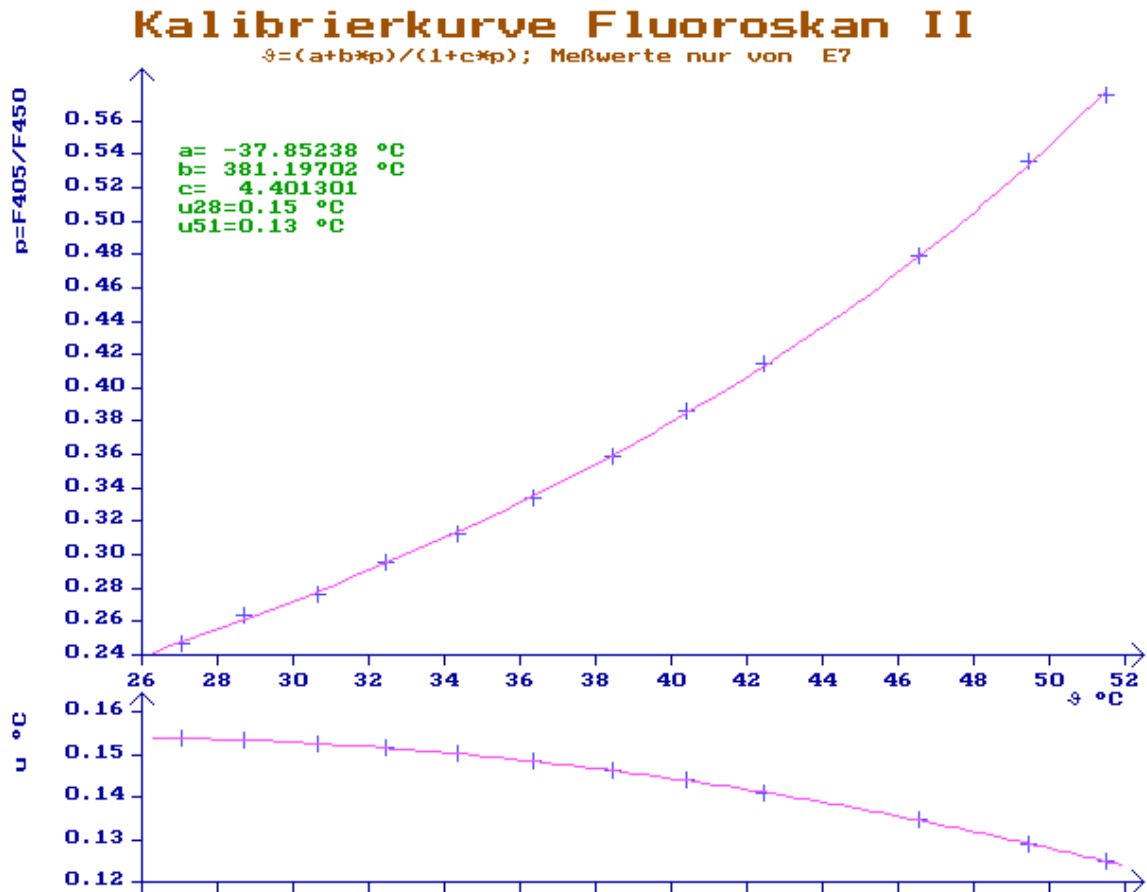


Abb. 2.4: oberes Diagramm: Verlauf der Kalibrierkurve auf Grundlage der Fluoreszenz-Meßwerte vom Fluoroskan II zur Bestimmung der Welltemperatur aus den temperaturabhängigen Fluoreszenzen; Lösung: 130µl 2µM HPTS in 0.1M TRIS (pH=7.51 bei 22.5°C), Corning Costar-MTP Thermowell 6510, F405: Fluoreszenzmeßwerte bei Excitation=405 nm, F450: Fluoreszenzmeßwerte bei Excitation=450 nm, Emission=538 nm bei beiden, p nach Gleichung (2.4), a,b,c, nach Ansatz (2.7), ohne Folie, Dachheizung 3°C wärmer als Heizkörper. Die Referenztemperaturen wurden mit Gleichung (2.6) auf Welltemperaturen umgerechnet. Die Größe u ist die Unsicherheit der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ϑ (u ist abhängig von p, von $d\vartheta/dp$ und von der empirischen Standardabweichung der Fluoreszenzmeßwerte), berechnet für 28°C (u_{28}) und 51°C (u_{51}); unteres Diagramm: Verlauf von u in Abhängigkeit von der Temperatur ϑ . F405, F450 in dieser Abbildung sind identisch $F_{405 \text{ nm}}$, $F_{450 \text{ nm}}$ im Text.

Eine lineare Regression liefert den Zusammenhang ($R=0.9999$):

$$\vartheta_L = \vartheta_H \cdot 1.0095 + 0.9443^{\circ}\text{C} \quad (2.6)$$

mit Lösungstemperatur ϑ_L und Heizkörpertemperatur ϑ_H .

Zur Ermittlung der korrekten Parameter a,b,c müssen die Heizkörpertemperaturen mit dieser Gleichung in Lösungstemperaturen umgerechnet werden. In dieser Gleichung ist sowohl der systematische Fehler des ISM 01 als auch eine tatsächlich vorhandene Differenz zwischen beiden Temperaturen enthalten. Beides tritt aber sowohl während der Kalibrierung als auch während der späteren Messung auf, hebt sich also auf. Eine unter diesen Bedingungen aufgenommene Meßwertschar zeigt Abb. 2.4 oben. Die Wertepaare $(\vartheta_i, p_i(\vartheta_i))$ lassen sich zur

Bestimmung der Parameter a, b, c aus Gleichung (2.5) mit Hilfe des Algorithmus nach [Cumme 1998] verwenden. Die Funktion $p(\vartheta)$ ist eine Kalibrierkurve, s. Abb. 2.4, oberes Diagramm. Aus ihrer Umkehrfunktion Gleichung (2.5) läßt sich mit Hilfe von zwei Fluoreszenzmessungen je Well dessen Temperatur berechnen. Die Unsicherheit u der so mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur in einem Well aufgrund der empirischen Standardabweichung der Fluoreszenzmeßwerte ist in Abb. 2.4, unteres Diagramm, dargestellt.

Zur Berechnung der Lösungstemperatur mit Hilfe des nach Gleichung (2.4) berechneten Verhältnisses p der beiden gemessenen Fluoreszenzen dient die Kalibrierkurve nach Abb. 2.4, oberes Diagramm. Die Parameter a, b, c wurden mit dem Algorithmus [Cumme 1998] nach folgendem Kriterium berechnet:

$$\sum_{i=1}^I \left(v_i - \frac{a + b \cdot p_i}{1 + c \cdot p_i} \right)^2 \rightarrow \text{Min} \quad (2.7)$$

2.3. Berechnung der Homogenität der Temperaturverteilung

Die Homogenität der Temperaturverteilung gibt an, wie gleichmäßig die Welltemperaturen verteilt sind. Sie wird wie die empirische Standardabweichung s einer Stichprobe des Umfangs 96 aus einer normalverteilten Grundgesamtheit berechnet und ist in dieser Arbeit immer als $1-s$ angegeben. Die Berechnung geschieht auf Grundlage der Temperaturen aller 96 Wells. Die gemessene Temperaturverteilung wird dabei als Momentaufnahme angesehen. Bei einer normalverteilten Zufallsgröße wird vorausgesetzt, daß eine beliebige Realisierung keinen Einfluß auf eine andere Realisierung hat. Im vorliegenden Fall ist aber ein letztendlich nützlicher Einfluß durch Wärmetransport gegeben.

Zur korrekten Beurteilung der Homogenität ist die alleinige Betrachtung ihres Zahlenwertes nicht ausreichend, denn eine gegebene Homogenität kann sowohl durch eine sehr gleichmäßig verteilte Temperatur und einem Ausreißer als auch durch viele weniger gleichmäßig verteilte Temperaturen ohne ausgesprochene Ausreißer sowie durch Gradienten über die MTP hervorgerufen worden sein. Deshalb wird zusätzlich die Differenz aus der maximalen und der minimalen mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur angegeben, auch als Variationsbreite oder Spannweite bezeichnet. Es empfiehlt sich die Betrachtung des Bildes der Temperaturverteilung, das die Abweichung jeder einzelnen Welltemperatur vom Mittelwert aller 96 Welltemperaturen zeigt. Um einen Vergleich der empirischen Standardabweichungen bei verschiedenen Temperatur-Mittelwerten zu ermöglichen, wurde zusätzlich der Variationskoeffizient, Abk. VK, angegeben. Er wird aus dem Verhältnis von empirischer Standardabweichung und Mittelwert berechnet und in Prozent angegeben. Abb. 2.5 zeigt beispielhaft vier solcher Momentaufnahmen einer Temperaturverteilung.

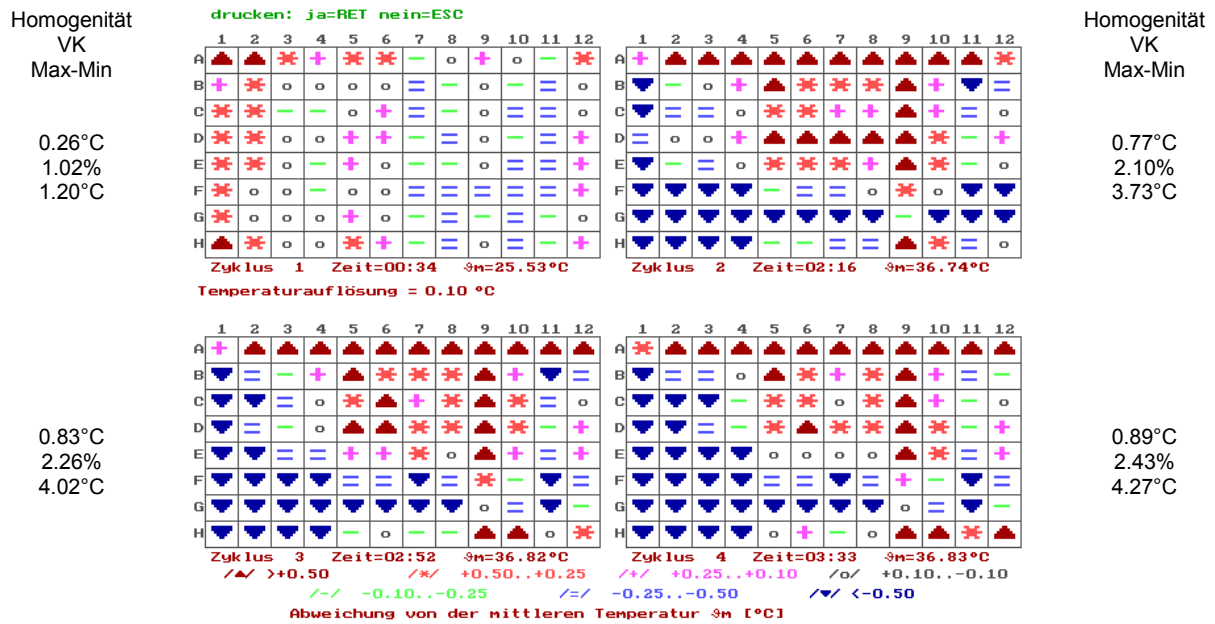


Abb. 2.5: Darstellung einer mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperaturverteilung. Es sind schematisch vier MTP einschließlich der Wellbezeichnung dargestellt. An jeder Wellposition befindet sich ein Zeichen, das die Abweichung der entsprechenden Welltemperatur zum Temperaturmittelwert $\bar{\theta}_m$ dieser MTP repräsentiert. Der Temperaturmittelwert ist rechts unten an der MTP angegeben. Rote Zeichen zeigen eine Überschreitung, blaue eine Unterschreitung des Mittelwertes an. Durch die Form des Zeichens kann mit Hilfe der Legende unterhalb der unteren beiden MTP auf das Intervall geschlossen werden, in dem die betreffende Welltemperatur relativ zum Mittelwert liegt. Unterhalb jeder MTP ist außer dem Temperaturmittelwert der Meßzeitpunkt dieser MTP relativ zum Beginn in der Form Minuten:Sekunden angegeben sowie der Zyklus. Er bezeichnet die Nummer der Messung bei wiederholter Messung der Temperaturen mit Hilfe des optischen Thermometers unter sonst gleichen Bedingungen, insbes. ohne Wechsel der MTP oder der Lösung. Links der linken beiden und rechts der rechten beiden MTP sind, wie ganz oben in der Abbildung gezeigt, übereinander die Werte Homogenität, VK und die Differenz zwischen der größten und der kleinsten mit Hilfe des optischen Thermometers gemessenen Temperatur angegeben. Gefordert wird eine gute Homogenität, also eine geringe zugehörige Maßzahl.

2.4. Meßunsicherheit der Kalibrierkurven

Es wurden vier Effekte erkannt, die die mittels des optischen Thermometers in einem Well gemessene Temperatur unerwünscht beeinflussen:

- Blasen an Wellwänden oder –böden:

Das optische Thermometer kann, muß jedoch nicht, in blasenhaltigen Wells Temperaturen messen, die von denen in den Nachbarwells auffällig abweichen. Zur Vermeidung dieses möglichen Fehlereinflusses ist die Lösung vor dem Füllen der MTP im Ultraschallbad 15 min lang zu entgasen. MTP dürfen vor Beginn der Messungen nicht sehr lange stehen. Füllen und Messen muß am gleichen Tag passieren. Längeres Stehenlassen gefüllter MTP führt andererseits nicht unbedingt zur Blasenbildung.

- schiefe Lösungsoberfläche:

Beim Befüllen der MTP ist darauf zu achten, daß die Spitzen des Pipettierroboters nicht die Wellwände berühren, weil sonst die Oberfläche der Lösung unkontrollierbar schief wird. Das führt aufgrund wellenlängenabhängiger Brechung zu mittels des optischen Thermometers um zwei bis drei Zehntel Grad zu hoch gemessenen Temperaturen in diesen Wells. Schütteln beseitigt den Effekt nicht. Es können keine wirklichen Temperaturdifferenzen sein, weil diese bei Vorhandensein eines homogenisierenden Aluminiumblocks mit der Zeit verschwinden müßten.

- Meniskus:

Selten entsteht eine rotationssymmetrisch durchgebogene Lösungsoberfläche, auch in mehreren nebeneinanderliegenden Wells eines Nunc-strips. Die Ränder sind etwa 1.5 mm höher als die Mitte. Der Effekt ist deutlich an den gegenüber nicht betroffenen Wells kleiner erscheinenden Bodendurchmessern der Wells zu erkennen. Er bewirkt eine mittels des optischen Thermometers um zwei bis drei Zehntel Grad zu hoch gemessene Temperatur in diesem Well. Dieser Fehler kann bisher nur durch visuelle Kontrolle erkannt werden.

Die durch das Eintauchen des Fühlers veränderte Oberflächenform ist bei Greiner-F MTP und bei Nunc-strips nicht für eine mittels des optischen Thermometers gegenüber den Nachbarwells abweichend gemessene Temperatur im Referenzwell verantwortlich, wenn geschüttelt wird. Das Schütteln vor dem Messen im absorbanzmessenden Reader macht die durch das Eintauchen erfolgte Oberflächenänderung wieder rückgängig.

- Verdunstung:

Die Verdunstung der Lösung ist besonders in den Randwells bei Meßzeiträumen im Stundenbereich augenfällig. Sie führt zu einer verminderten Schichtdicke und zum Beschlagen des optischen Kanals mit Kondenswasser. Die sinkende Schichtdicke führt zumindest bei auflichtmessenden Readern ebenfalls zu Meßfehlern.

Die Verdunstung ist eine mögliche Ursache von Temperaturinhomogenitäten: Randwells kühlen infolge besserem Abzug der verdunsteten Flüssigkeit stärker ab als innen liegende. In

wärmeren Wells läuft die Verdunstung schneller ab als in kälteren. Eine hierauf beruhende Homogenisierung konnte nicht beobachtet werden.

Zur Vermeidung der Verdunstung kann auf die MTP eine transparente Folie geklebt werden. Diese muß optisch transparent sein, um die Meßwerte nicht zu verfälschen. Da die Folie kälter als die Lösung bleibt, schlägt sich an ihr jetzt das Kondenswasser nieder. Aus diesem Grund muß eine Dachheizung im Reader während des Meßvorgangs für eine geringfügig über der Lösungstemperatur liegende Lufttemperatur im Volumen oberhalb der Folie sorgen. Die Folie nimmt die Lufttemperatur an und beschlägt nicht mehr.

2.4.1. absorbanzmessender Reader

Die folgenden Messungen wurden mit Hilfe der in Abschnitt 3.1.1. beschriebenen Temperierkammer durchgeführt.

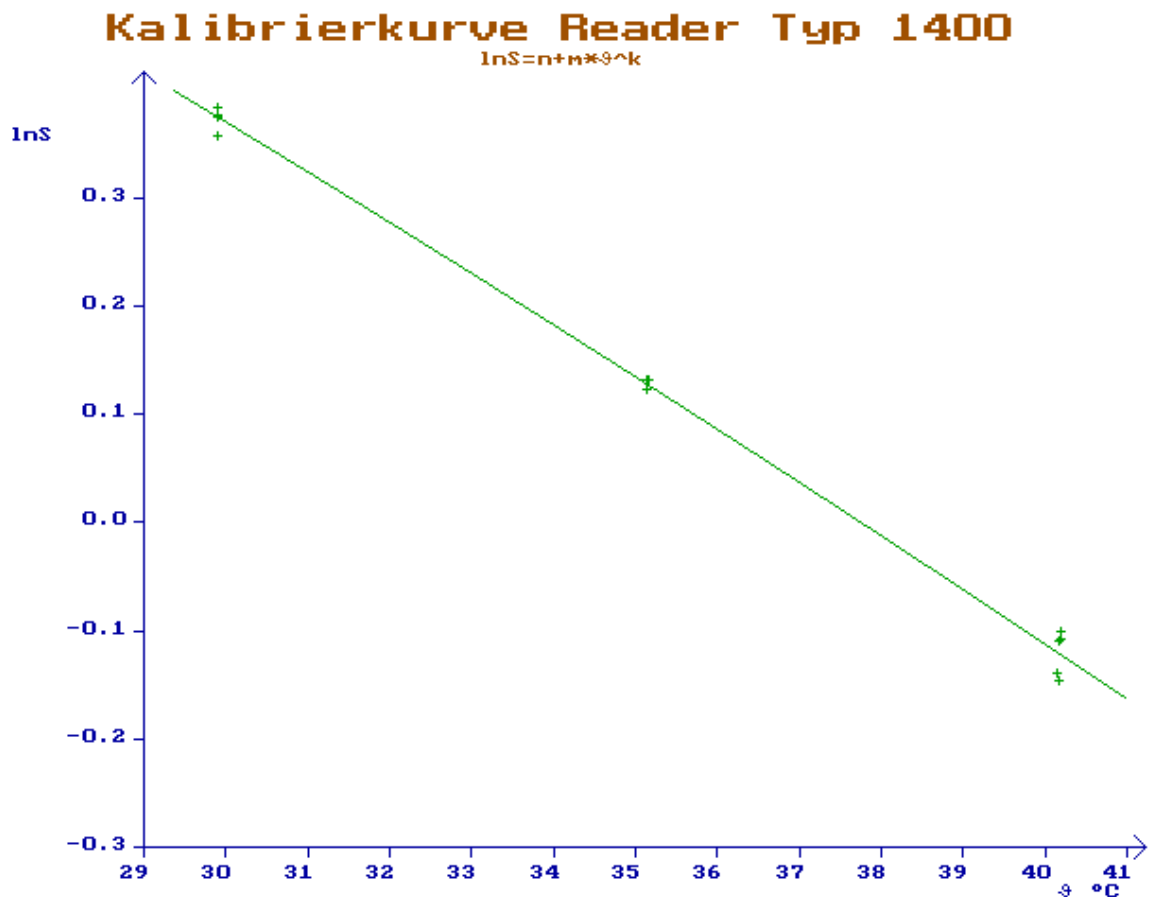


Abb. 2.6: Lage von fünf Meßpunkten gleicher Temperatur bei insgesamt drei verschiedenen Temperaturen und der daraus nach Gleichung (2.3) berechneten Kalibrierkurve, Wertepaare vom Well E7, Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.2).

Zur Ermittlung der Unsicherheit eines Meßpunktes, der zur Berechnung der Parameter der Kalibrierkurve dient, wurde ein solcher Meßpunkt fünfmal nacheinander bei gleicher Temperatur und mit derselben Lösung aufgenommen (Fehler in der Serie). Vor der Aufnahme eines jeden Meßpunktes wurde der Heizkörper samt Lösung geschüttelt und dann die Meßposition des Heizkörpers erneut angefahren. Diese Prozedur wurde mit derselben Lösung für drei

verschiedene Temperaturen in der Reihenfolge steigender Lösungstemperatur durchgeführt. Es wurde keine Folie auf die Nunc-strips geklebt. Der Sensor des Referenzthermometers befand sich immer im Well E7. Die Ergebnisse dieser Messungen und die daraus ermittelte Kalibrierkurve sind in Abb. 2.6 dargestellt. Aus der größten vertikalen Abweichung der Meßpunkte gleicher Temperatur läßt sich mit Hilfe des Anstiegs der Kalibrierkurve die Variationsbreite der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ermitteln. Es ist die in eine Temperaturdifferenz umgerechnete Differenz zwischen den am weitesten außen liegenden Meßpunkten gleicher Temperatur: 0.7°C bei 30°C, 0.2°C bei 35°C und 1°C bei 40°C.

Zur Ermittlung der Unsicherheit der Lage der Kalibrierkurve wurde diese viermal nacheinander aufgenommen (Fehler zwischen den Serien). Vor der Aufnahme eines jeden einzelnen Meßpunktes wurde der Heizkörper samt Lösung geschüttelt. Dabei wurden für jede einzelne Kurve neue Nunc-strips in den Heizkörper eingesetzt und mit der gleichen, aber unbenutzten TRIS-Kresolrot-Lösung befüllt. Es wurde ebenfalls keine Folie auf die Nunc-strips geklebt. Der Sensor des Referenzthermometers befand sich ebenfalls immer im Well E7. Die so ermittelten Kalibrierkurven sind in Abb. 2.7 dargestellt.

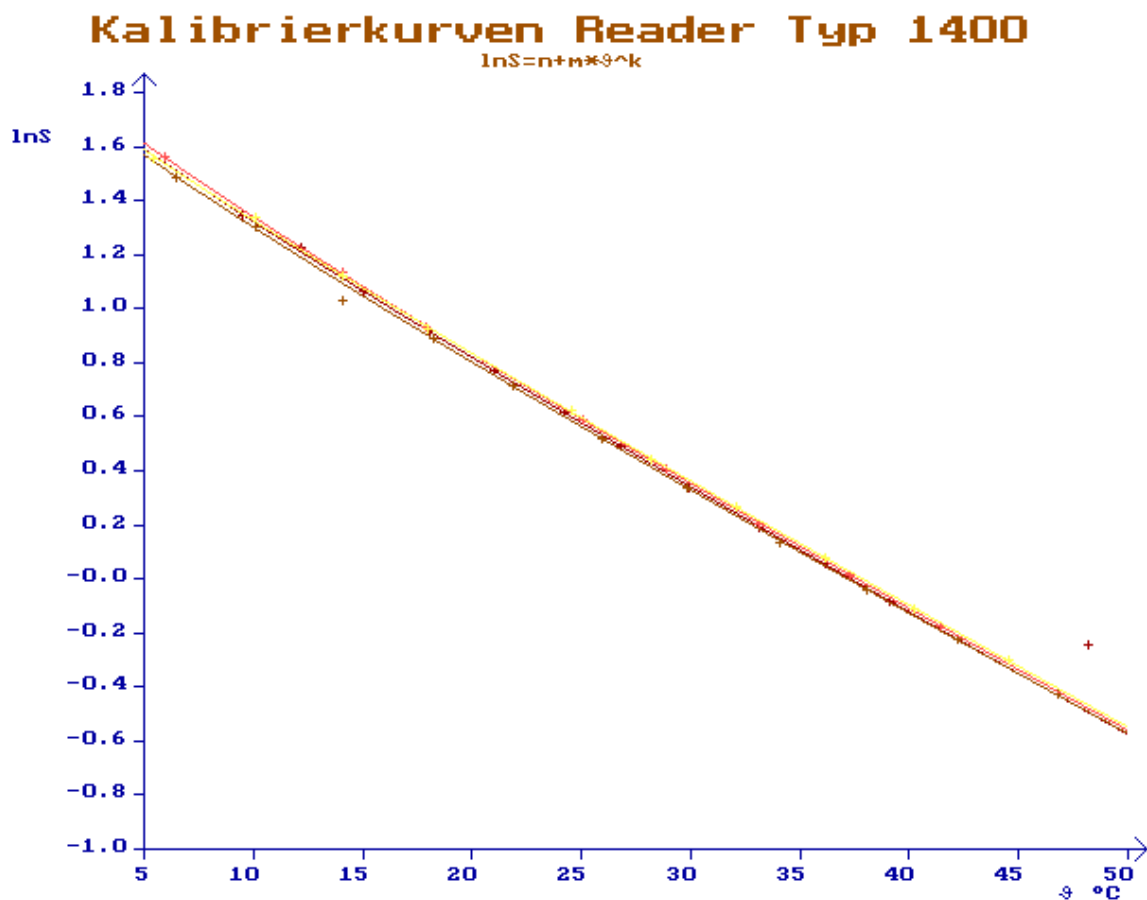


Abb. 2.7: Lage der Kalibrierkurven bei viermaliger Aufnahme: Bei jeder einzelnen Kurve wurden die Nunc-strips im Heizkörper durch unbenutzte ersetzt und neu befüllt; Wertepaare vom Well E7, Absorbanzfunktion S nach Gleichung (2.2).

Aus der größten horizontalen Abweichung aller Kalibrierkurven bei gleichem InS läßt sich die Variationsbreite der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ermitteln. Es ist die Temperaturdifferenz, die die am weitesten außen liegenden Kalibrierkurven für gleiches InS aufweisen: 1°C bei 20°C , 1.1°C bei 35 und 50°C .

Eine weitere Untersuchung galt der Stabilität der TRIS-Kresolrot-Lösung gegenüber Temperatureinwirkung. Es muß gewährleistet sein, daß sich die wellenlängenabhängige Absorbanz nur mit der Lösungstemperatur ändert, nicht aber mit der Zeit. Zur Untersuchung dieser Bedingung wurden die in einem Well in der Mitte der MTP, dem Referenzwell, mittels des DTMS $5\ldots 60^{\circ}\text{C}$ gemessenen und die mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperaturen über einen Zeitraum von 20 min ausgewertet. Es darf sich mit der Zeit keine Änderung der geringen Differenz zwischen beiden gemessenen Temperaturen ergeben. Driften die beiden Meßwerte dagegen auseinander, ist dies ein Hinweis auf eine Instabilität der TRIS-Kresolrot-Lösung. Zur Sicherheit gegen ein Verfälschen der gemessenen Absorbanzen und damit der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur im Referenzwell durch ein Verrutschen des Sensors wurde die mittels des optischen Thermometers gemessene Temperatur eines Nachbarwells mit ausgewertet. Diese muß immer ganz nahe an der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur des Referenzwells liegen. Dazu wurde für jede der drei Temperaturen 22 , 37 und 53°C eine TRIS-Kresolrot-Lösung in Nunc-strips gefüllt, aufgeheizt und danach gemessen. Bei 22°C ist keine Änderung der Differenz zwischen mittels des DTMS $5\ldots 60^{\circ}\text{C}$ gemessener und mittels des optischen Thermometers gemessener Temperatur im Referenzwell erkennbar. Bei 37 und 53°C ist eine Abnahme der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur gegenüber der gemessenen von 0.1°C im Zeitraum von 20 min zu verzeichnen. Die erhaltene konstante Differenz der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperaturen des Referenz- und des Nachbarwells bestätigt, daß der Temperatursensor keinen Einfluß auf die mittels des optischen Thermometers gemessene Lösungstemperatur des Referenzwells hat. Die Kalibrierkurve ist fehlerbehaftet. Das Referenzthermometer DTMS $5\ldots 60^{\circ}\text{C}$ und der Reader liefern jeweils einen systematischen und einen zufälligen Fehler. Der systematische Fehler der Absorbanzmessungen des Readers geht bei Temperaturbestimmung mit Hilfe einer späteren Messung nicht ein, da er bei der Kalibrierung und bei der späteren Messung mit gleichem Vorzeichen und gleicher Größe auftritt. Die Unsicherheit der mit Hilfe des optischen Thermometers gemessenen Temperatur aufgrund des zufälligen Fehlers der Absorbanzmessungen des Readers ist in Abb. 2.10, unteres Diagramm, dargestellt. Sie ist temperaturabhängig und beträgt 0.1°C bei 37°C . Die Diskussion erfolgt im Abschnitt 2.5..

Beim Eintauchen des Temperatursensors in das Referenzwell wird der Lichtweg infolge Wasserverdrängung erhöht. Die Absorbanz steigt ebenfalls. Für ein Lösungsvolumen von $250\text{ }\mu\text{l}$ in Nunc-strips und eine Eintauchtiefe des Sensors von 4 mm ergibt sich eine Licht-

wegerhöhung von 0.035 mm. Die mit Hilfe des optischen Thermometers gemessene Temperatur mit Sensor im Well liegt für die Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.1) um höchstens 0.005°C neben der mit Hilfe des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ohne Sensor im Well, für Gleichung (2.2) entsprechend höchstens 0.001°C. Diese Abweichung wurde rechnerisch über die Lichtwegerhöhung durch den eingetauchten Sensor ermittelt.

Der Fehler bei wiederholtem Anfahren und Messen desselben Wells ist bei allen drei Temperaturen größer als die Unsicherheit einer einzelnen mit Hilfe des optischen Thermometers gemessenen Temperatur. Daraus folgt, daß außer den zufälligen Fehlern der Absorbanzmessungen noch weitere Fehler auftreten: Positionierfehler des Schlittens relativ zum Meßkanal und veränderte Oberfläche der Lösung nach dem Schütteln bzw. nach dem Fahren. Der Fehler bei Wiederholung der Kalibrierkurve ist nochmals geringfügig größer als der bei Wiederholung der Messung in demselben Well. Hier treten noch weitere Fehlereinflüsse auf: Volumenfehler des Pipettierroboters, veränderte Wellbodenabsorbanz und verschieden gute Paßfähigkeit von einem Satz Nunc-strips zum nächsten.

Die beobachtete Stabilität der TRIS-Kresolrot-Lösung gegenüber Temperatureinfluß ist so groß, daß die Änderung der mit Hilfe des optischen Thermometers gemessenen Temperatur im Vergleich zur mit dem Referenzthermometer gemessenen Temperatur für die Aufheizzeit vernachlässigt werden kann. Da das schnelle Aufheizen nach 2...3 min beendet ist, spielt die ermittelte Abweichung der berechneten Temperatur von -0.1°C in 20 min innerhalb der Aufheizzeit noch keine entscheidende Rolle. Dieser Fehleranteil ist systematischer Natur, so daß die berechnete Homogenität nicht beeinflußt wird.

Insgesamt treten folgende Fehler auf, die die mit Hilfe des optischen Thermometers gemessene Lösungstemperatur beeinflussen:

- (1) die Fehlergrenze des Referenzthermometers von 0.04°C nach Gleichung (2.12),
- (2) der in eine Temperaturunsicherheit von 0.1°C umgerechnete zufällige Fehler beider bzw. aller drei zeitlich nacheinander liegenden Absorbanzmessungen des Readers nach Abb. 2.10,
- (3) der Fehler beim wiederholten Anfahren desselben Wells und nachfolgendem Messen (Variationsbreite 0.2°C bei 35°C, $s=0.06^\circ\text{C}$) nach Abb. 2.6,
- (4) der Fehler bei wiederholter Aufnahme der Kalibrierkurve (Variationsbreite 1.1°C bei 35°C, $s=0.32^\circ\text{C}$) nach Abb. 2.7 sowie
- (5) die Instabilität der TRIS-Kresolrot-Lösung (-0.1°C nach 20 min).

Die empirischen Standardabweichungen s wurden mittels Division der Variationsbreite durch $2\cdot\sqrt{3}$ ermittelt [Bronstein u.a. 1979 S.705]. Dabei wurde die Gleichverteilung der Temperaturmeßwerte in der Variationsbreite vorausgesetzt.

Auf die berechnete Homogenität der Temperaturverteilung hat nur Fehler (2) Einfluß. Damit liefert das optische Thermometer auf TRIS-Kresolrot-Basis bereits eine Meßunsicherheit

einer einzelnen Messung in der Größe der eingangs gestellten Forderungen bzgl. Homogenität und Unsicherheit. Für die Bestimmung einer Lösungstemperatur sind zusätzlich die Fehler (1) und (4) zu berücksichtigen. Fehler (4) kennzeichnet die Empfindlichkeit des optischen Thermometers gegenüber dem Vorgang, die MTP wiederholt zu befüllen. Der Fehler ist an verschiedenen berechneten Parametern n, m, k in der Gleichung (2.3) erkennbar. Er muß berücksichtigt werden, wenn eine Temperaturbestimmung mit bereits durchgeführter Kalibrierung, aber neu befüllter MTP durchgeführt werden soll. Fehler (3) ist in Fehler (4) enthalten. Fehler (5) kann vernachlässigt werden, da er innerhalb der geforderten Aufheizzeit keinen nennenswerten Anteil bringt. Die unkorrelierte Überlagerung der Fehler (1), (2) und (4) liefert 0.34°C . Dies ist die Unsicherheit u der Bestimmung der Lösungstemperatur. Dieser Wert ist deutlich größer als in der Aufgabenstellung gefordert. Er kann durch andersartige Messung der Lösungstemperatur in einem Well, dem Referenzwell, verringert werden, indem die Lösungstemperaturen der 95 anderen Wells relativ zum Referenzwell berechnet wird.

Die Fehlergrenze des Temperaturregelsystems für die beheizbare Küvette hat für die Ermittlung der Lösungstemperatur keine Bedeutung. Der systematische Anteil entfällt, weil das im Well vorhandene Referenzthermometer beim Kalibrieren verwendet wird. Der zufällige Anteil wurde durch Betrachtung der Variationsbreite der ADU-Digitalwerte von 4 LSB zu $s \leq 0.002^{\circ}\text{C}$ bestimmt. Dieser Anteil bewirkt eine geringfügig schwankende Heizleistung in der beheizbaren Küvette, die aber durch die thermische Trägheit zwischen Wärmequelle und Lösung keine schwankende Lösungstemperatur zur Folge hat.

Wie in einem Experiment gemessen wurde, liegt bei Raumtemperatur die Homogenität der mit dem optischen Thermometer gemessenen Temperaturverteilung bei $0.06 \dots 0.08^{\circ}\text{C}$ (ohne Abb.), wenn ein homogenisierender Metallkörper verwendet wird. D.h., die Homogenität über die ganze MTP ist etwas besser als die Unsicherheit der mit dem optischen Thermometer gemessenen Temperatur in einem einzelnen Well nach Fehler (2). Folglich ist die tatsächliche Unsicherheit der mit dem optischen Thermometer gemessenen Temperatur geringer als Fehler (2). Die Unsicherheit einer einzelnen Welltemperatur muß sogar noch unter den gemessenen $0.06 \dots 0.08^{\circ}\text{C}$ liegen, weil bei dieser Messung noch Positionier- und Oberflächenfehler enthalten sind. Die TRIS-Kresolrot-Lösung ist damit zur Beurteilung der Homogenität der Temperaturverteilung in einer MTP gut geeignet.

2.4.2. fluoreszenzmessender Reader

Die folgenden Messungen wurden mit Hilfe des in Abschnitt 3.1.2. beschriebenen Temperiersystems durchgeführt.

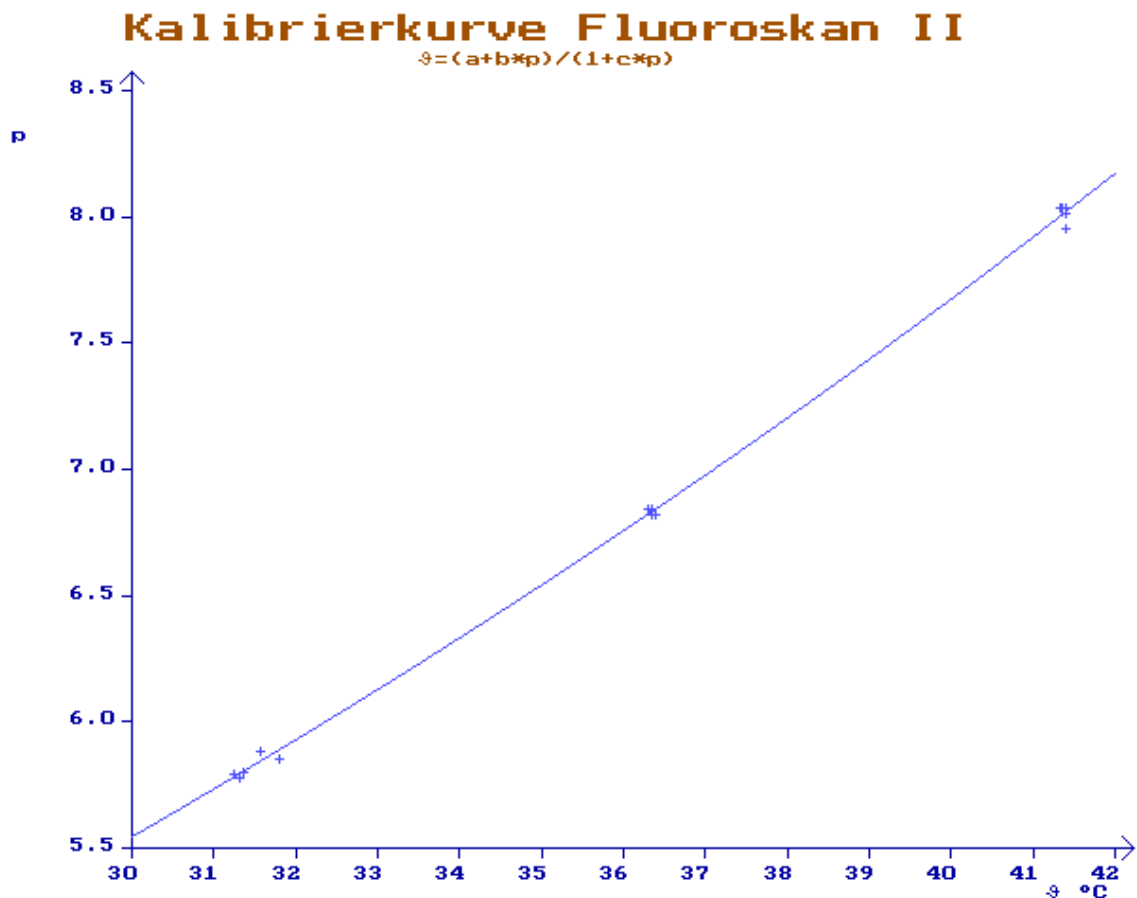


Abb. 2.8: Lage von fünf Meßpunkten gleicher Temperatur bei insgesamt drei verschiedenen Temperaturen und der daraus nach Gleichung (2.5) berechneten Kalibrierkurve, Wertepaare vom Well E7.

Zur Ermittlung der Unsicherheit eines Meßpunktes wurde wie beim absorbanzmessenden Reader ein solcher Meßpunkt fünfmal nacheinander bei gleicher Temperatur und mit derselben Lösung aufgenommen (Fehler in der Serie). Zur Aufnahme eines jeden Meßpunktes wurde die Meßposition des Heizkörpers erneut angefahren. Diese Prozedur wurde mit derselben Lösung für drei verschiedene Temperaturen in der Reihenfolge steigender Lösungstemperatur durchgeführt. Es wurde keine Folie auf die MTP geklebt. Die Heizkörpertemperaturen wurden mit Gleichung (2.6) in Lösungstemperaturen umgerechnet. Die Ergebnisse dieser Messungen und die daraus ermittelte Kalibrierkurve sind in Abb. 2.8 dargestellt. Aus der größten vertikalen Abweichung der Meßpunkte voneinander bei gleicher Temperatur läßt sich mit Hilfe des Anstiegs der Kalibrierkurve die Variationsbreite der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ermitteln: 0.12°C bei 36.5°C und 0.4°C bei 41.5°C.

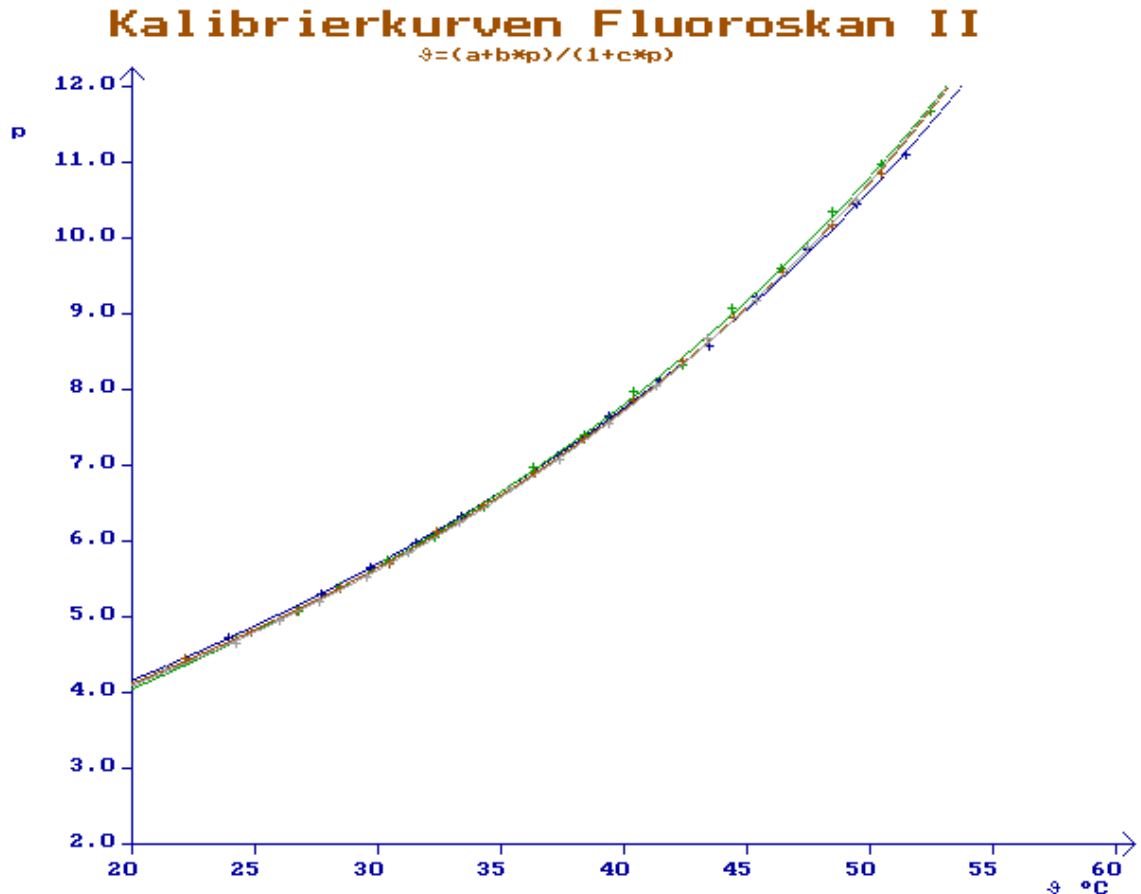


Abb. 2.9: Lage der Kalibrierkurven bei viermaliger Aufnahme: Bei jeder einzelnen Kurve wurde die MTP im Heizkörper durch eine unbenutzte ersetzt und neu befüllt, Wertepaare vom Well E7.

Zur Ermittlung der Unsicherheit der Lage der Kalibrierkurve wurde diese ebenfalls viermal nacheinander aufgenommen (Fehler zwischen den Serien). Dabei wurde für jede einzelne Kurve eine neue MTP in den Heizkörper eingesetzt und mit der gleichen, aber unbenutzten TRIS-HPTS-Lösung befüllt. Es wurde keine Folie auf die MTP geklebt. Die Heizkörpertemperaturen wurden wieder mit Gleichung (2.6) in Lösungstemperaturen umgerechnet. Die so ermittelten Kalibrierkurven sind in Abb. 2.9 dargestellt. Aus der größten horizontalen Abweichung der Kalibrierkurven voneinander bei gleichem Fluoreszenzverhältnis p läßt sich die Variationsbreite der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ermitteln: 0.6°C bei 25°C und 0.4°C bei 35°C und 50°C .

Weiterhin wurde die Stabilität der TRIS-HPTS-Lösung gegenüber Temperatureinfluß untersucht. Dazu wurde die Spalte 1 einer Corning Costar-MTP Thermowell 6510 mit TRIS-HPTS-Lösung befüllt und bei 37°C in einem Wärmeschrank gelagert (Tabelle 2.1, letzte Zeile). In gewissen Zeitabständen wurden die Spalten 2 bis 10 befüllt, wobei die MTP incl. Folie wegen Verdunstungsschutz in der Zwischenzeit immer im Wärmeschrank stand. Zum Schluß wurden die Spalten 11 und 12 befüllt. In allen Spalten befindet sich nun die gleiche TRIS-HPTS-Lösung, deren Verweilzeit im Wärmeschrank aber unterschiedlich groß war (Tabelle 2.1, 1. Spalte). Die Verweilzeit der Spalten 11 und 12 im Wärmeschrank war gleich Null. Die jetzt vollständig befüllte MTP wurde auf 24.08°C abgekühlt und im Fluoroskan II

vermessen [Poppitz 1999]. Die aus diesen Meßwerten gewonnenen mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperaturen müssen alle wieder bei 24.08°C liegen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 2.1, letzte Spalte: Je länger sich die TRIS-HPTS-Lösung im Wärmeschrank befand, um so niedriger wird die mittels des optischen Thermometers gemessene gegenüber der tatsächlichen Temperatur. Nach 15 min Verweilzeit beträgt der Fehler -0.58°C, nach 30 min -0.74°C.

Zeit bei 37°C	F_{405nm}	F_{450nm}	$p=F_{405}/F_{450}$	gemessene Temperatur ¹⁾	Ausgangs- temperatur	Temperatur- differenz
0 h	145.7	625.5	0.2329	24.08°C	24.08°C	0.00°C
0 h	149.9	644.8	0.2325	24.02°C	24.08°C	-0.06°C
0.25 h	150	655.4	0.2289	23.51°C	24.08°C	-0.58°C
0.5 h	147.9	649.5	0.2277	23.34°C	24.08°C	-0.74°C
1 h	148.4	663.6	0.2236	22.75°C	24.08°C	-1.34°C
1.5 h	148.2	664.8	0.2229	22.64°C	24.08°C	-1.44°C
2 h	151.4	686.2	0.2206	22.31°C	24.08°C	-1.78°C
2.75 h	147	668.9	0.2198	22.18°C	24.08°C	-1.91°C
3.75 h	151.2	691.8	0.2186	22.00°C	24.08°C	-2.09°C
5.25 h	150.6	695.2	0.2166	21.71°C	24.08°C	-2.38°C
6.25 h	152.7	711.8	0.2145	21.39°C	24.08°C	-2.70°C
7.25 h	157.3	765.4	0.2055	19.99°C	24.08°C	-4.10°C

Tabelle 2.1: Einfluß der Verweilzeit von TRIS-HPTS-Lösung im Wärmeschrank bei 37°C auf die mittels des optischen Thermometers gemessene Temperatur bei 24°C, Tabelle nach [Poppitz 1999], ¹⁾ mittels des optischen Thermometers

Beide Fluoreszenzmeßwerte steigen mit der Verweildauer im Wärmeschrank. F_{405nm} verhält sich wie bei steigender Temperatur, F_{450nm} wie bei fallender, vgl. mit Abb. 2.3. Als Ursache kommen Verdunstung durch die aufgeklebte Folie hindurch sowie Instabilität der Lösung in Betracht. Eine Meßwertzunahme infolge Konzentrationserhöhung durch Verdunstung kann aufgrund hier nicht näher dargestellter Überlegungen begründet werden. In diesem Fall müßte jedoch die prozentuale Zunahme der Meßwerte beider Wellenlängen etwa gleich ausfallen. Nach Tabelle 2.1 nimmt die Fluoreszenz bei 405 nm um etwa 8% zu, die bei 450 nm um etwa 22%. Also muß unabhängig von einer Verdunstung ein instabil wirkender Anteil vorhanden sein.

Da der zufällige Fehler der Meßwerte des Temperaturmeßsystems ISM 01 nach Gleichung (2.8) mit 0.03°C deutlich kleiner ist, wie gleich gezeigt wird, als die im folgenden abgeleitete Unsicherheit der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur, ist der Ansatz (2.7) zum Erhalt einer aus dem Fluoreszenzverhältnis p maximal gut vorausgesagten Temperatur ϑ berechtigt.

Der zufällige Fehler des ISM 01 wird wie folgt bestimmt. Die Auflösung der Anzeige des ISM 01 beträgt 0.01°C. Der Meßwert springt je nach Temperatur bei langsamen Änderungen um 0.02, 0.03 und selten 0.05°C. Dieses Springen ist keine Schwankung um einen Mittelwert. Die Anzeige folgt einer driftenden Eingangsgröße mit verschiedenen großen Sprüngen. Die Ursache liegt in geräteinternen Baugruppen wie Multiplexer und AD-Wandler [Schwarz-

hans 2001]. Deshalb wurde zur Ermittlung des zufälligen Fehlers nicht eine konstante Temperatur an den Sensor gelegt, sondern eine sehr langsam steigende. Statt dem Mittelwert aller Meßwerte als Basis zur Berechnung wurde die Regressionsgerade benutzt. Der so ermittelte zufällige Fehler des ISM 01 beträgt

$$s_{\text{ISM 01}} = 0.03^{\circ}\text{C} \quad (2.8).$$

Zur Bestimmung der Unsicherheit der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ϑ wird wie folgt vorgegangen: Zunächst wird die Gleichung (2.5) in die Gleichung (2.4) eingesetzt, um p zu eliminieren. Dann werden die partiellen Ableitungen $\partial\vartheta/\partial F_{405\text{nm}}$ und $\partial\vartheta/\partial F_{450\text{nm}}$ gebildet und jeweils mit der empirischen Standardabweichung der Fluoreszenzen $F_{405\text{nm}}$ und $F_{450\text{nm}}$ multipliziert. Sie ist das Produkt aus dem Fluoreszenzmittelwert und seinem VK. Für beide Wellenlängen wurde der VK in einem Well experimentell unter den Bedingungen 130 μl 2 μM HPTS in 0.1M TRIS pH=7.51 bei 22.5 $^{\circ}\text{C}$, Corning Costar-MTP Thermowell 6510 im Aluminium-Heizkörper, zu

$$\text{VK}_{\text{Well}} = 0.35 \%$$

ermittelt. Da beide empirischen Standardabweichungen unkorreliert sind, können sie quadratisch addiert werden. Es entsteht ein Ausdruck für die Unsicherheit u der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur ϑ , der im Bereich $a < \vartheta < b/c$ gilt:

$$u = \sqrt{2} \cdot \text{VK}_{\text{Well}} \cdot \frac{(a - \vartheta) \cdot (c \cdot \vartheta - b)}{b - a \cdot c} \quad (2.9).$$

Der Verlauf dieser Funktion ist als unteres Diagramm in Abb. 2.4 dargestellt. Das Nullsetzen der Ableitung $du/d\vartheta$ der Gleichung (2.9) liefert die Temperatur ϑ_{umax} des Maximums von u : Es ist

$$\vartheta_{\text{umax}} = \frac{a \cdot c + b}{2 \cdot c} \quad (2.10),$$

in der vorliegenden Abb. 2.4 ist $\vartheta_{\text{umax}} = 23.2^{\circ}\text{C}$ nach Gleichung (2.10). Da die zweite Ableitung der Gleichung (2.9)

$$\frac{d^2u}{d\vartheta^2} = \sqrt{2} \cdot \text{VK}_{\text{Well}} \cdot \frac{-2 \cdot c}{b - a \cdot c}$$

immer kleiner als Null ist, liegt bei ϑ_{umax} ein Maximum. Die Größe der Unsicherheit u an der Stelle ϑ_{umax} beträgt

$$u_{\max} = \sqrt{2} \cdot VK_{\text{Well}} \cdot \frac{b - a \cdot c}{4 \cdot c} \quad (2.11),$$

in der vorliegenden Abb. 2.4 ist $u_{\max}=0.152^{\circ}\text{C}$. Damit ist die Unsicherheit der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur etwas schlechter als die eingangs geforderte Homogenität von 0.1°C .

Der Fehler der mit Hilfe des optischen Thermometers gemessenen Temperatur bei wiederholtem Anfahren und Messen desselben Wells ist größer als die Unsicherheit nach Gleichung (2.9). Es müssen also auch hier außer den zufälligen Fehlern der Fluoreszenzmessungen noch weitere Fehler wie Positionierfehler des Schlittens relativ zum Meßkanal und veränderte Oberfläche der Lösung nach dem Fahren auftreten. Bei Wiederholung der Kalibrierkurve tritt ein etwas größerer Fehler der berechneten Temperatur auf als der bei Wiederholung der Messung in demselben Well. Hier treten prinzipiell die gleichen Fehlerursachen wie beim absorbanzmessenden Reader auf: zufälliger Volumenfehleranteil des Pipettierroboters, veränderte Form der MTP von einem Exemplar zum nächsten und damit verschiedene Lage eines Wells relativ zum Meßkanal und verschieden gute Paßfähigkeit. Der MTP-Typ Corning Costar Thermowell 6510 ist nach Herstellerangaben nicht für eine Applikation mit den Forderungen Paßgenauigkeit und Formschlüssigkeit vorgesehen.

Die Stabilität der TRIS-HPTS-Lösung gegenüber Temperatureinfluß ist deutlich schlechter als die der TRIS-Kresolrot-Lösung. Die Abweichung von -0.58°C nach nur 15 min ist zu viel im Vergleich zur Forderung nach einer Meßunsicherheit von 0.1°C .

Insgesamt treten folgende Fehler auf, die die mit Hilfe des optischen Thermometers gemessene Lösungstemperatur beeinflussen:

- (1) die Fehlergrenze des Referenzthermometers von 0.04°C nach Gleichung (2.12),
- (2) der in eine Temperaturunsicherheit von 0.15°C umgerechnete zufällige Fehler beider zeitlich nacheinander liegenden Fluoreszenzmessungen des Readers nach Gleichung (2.9),
- (3) der Fehler beim wiederholten Anfahren desselben Wells und nachfolgendem Messen (Variationsbreite 0.12°C bei 36.5°C , $s=0.035^{\circ}\text{C}$) nach Abb. 2.8,
- (4) der Fehler bei wiederholter Aufnahme der Kalibrierkurve (Variationsbreite 0.4°C bei 35°C , $s=0.12^{\circ}\text{C}$) nach Abb. 2.9,
- (5) die Instabilität der TRIS-HPTS-Lösung (-0.58°C nach 15 min) nach Tabelle 2.1 sowie
- (6) der zufällige Anteil in der Fehlergrenze des Temperaturregelsystems ISM 01 von 0.03°C nach Gleichung (2.8), der eine Unsicherheit der nach Gleichung (2.6) berechneten Lösungstemperatur bewirkt.

Die empirischen Standardabweichungen s wurden ebenfalls mittels Division der Variationsbreite durch $2\sqrt{3}$ ermittelt [Bronstein u.a. 1979 S.705]. Dabei wurde wieder die Gleichverteilung der Temperaturmeßwerte in der Variationsbreite vorausgesetzt.

Auf die berechnete Homogenität der Temperaturverteilung hat nur Fehler (2) Einfluß. D.h., das optische Thermometer auf der Basis TRIS-HPTS liefert eine Meßunsicherheit einer einzelnen Messung, die schlechter ist als die eingangs gestellte Forderung bzgl. Homogenität und Unsicherheit. Für die Bestimmung einer Lösungstemperatur sind zusätzlich die Fehler (1), (4) und (6) zu berücksichtigen. Fehler (4) ist an verschiedenen berechneten Parametern a, b, c in der Gleichung (2.5) erkennbar. Fehler (3) ist in Fehler (4) enthalten. Fehler (5) kann nur vernachlässigt werden, wenn keine langdauernden Messungen erforderlich sind. Da er systematischer Natur ist, kann er mittels Tabelle 2.1 herausgerechnet werden. Die unkorrelierte Überlagerung der Fehler (1), (2), (4) und (6) liefert 0.20°C . Dies ist wie beim absorbanzmessenden Reader die Unsicherheit u der Bestimmung der Lösungstemperatur.

Der systematische Anteil in der Fehlergrenze des Temperaturregelsystems ISM 01 hat keine Wirkung, weil er beim Kalibrieren und beim Messen mit gleicher Größe und gleichem Vorzeichen auftritt. Der zufällige Anteil bewirkt wie beim absorbanzmessenden Reader eine geringfügig schwankende Heizleistung, die aber ebenfalls keine schwankende Lösungstemperatur zur Folge hat.

Die mit dem optischen Thermometer auf TRIS-HPTS-Basis erreichte Unsicherheit der Temperaturmessung nach Fehler (2) von 0.15°C sowie die Meßunsicherheit bzgl. Bestimmung der Lösungstemperatur von 0.20°C liegen geringfügig oberhalb der in der Aufgabenstellung geforderten Werte.

Wie in einem Experiment gemessen wurde, liegt bei Raumtemperatur die Homogenität der mit dem optischen Thermometer gemessenen Temperaturverteilung bei 0.08°C (Abb. 3.4, Zyklus 1), wenn ein homogenisierender Metallkörper verwendet wird. D.h., die Homogenität über die MTP ist besser als die Unsicherheit der mit dem optischen Thermometer gemessenen Temperatur im Well nach Fehler (2). Damit muß die tatsächliche Unsicherheit der Temperaturmessung im fluoreszenzmessenden Reader kleiner als 0.08°C sein. Die TRIS-HPTS-Lösung ist also zur Beurteilung der Homogenität gut geeignet.

2.4.3. Das Referenzthermometer

Das Referenzthermometer DTMS 5...60°C hat lt. Werkprüfschein eine Fehlergrenze von $\pm 0.03^\circ\text{C} \pm 1$ Digit einschließlich Sensor bei einer Umgebungstemperatur von 10...50°C. Ein Digit entspricht 0.01°C . Damit beträgt seine Fehlergrenze

$$\delta_{\text{DTMS}} = 0.04^\circ\text{C} \quad (2.12).$$

Über den darin enthaltenen zufälligen Fehler liegt keine Herstellerangabe vor. Er wurde mittels Berechnung der empirischen Standardabweichung aus 100 Meßwerten bei gleicher Temperatur experimentell zu

$$s_{\text{DTMS}} \leq 0.01^{\circ}\text{C} \quad (2.13)$$

ermittelt. Das DTMS 5...60°C zeigt nicht jedes Hundertstel Grad an. Es läßt manchmal ein Hundertstel aus. Die Ursache ist der eingebaute 12 bit-Analog-Digital-Wandler, dessen least significant bit wegen dem großen Meßbereich von 5...60°C geringfügig größer als 0.01°C ist [Kuhn 2000].

Der Sensor ist ein NTC-Widerstand vom Typ 833ET-1 der Firma Dong Kwang Sensor IND. Co., LTD. Diese werden vom Thermometerwerk Geraberg nach 1/3 des spezifizierten Fehlers selektiert, einzeln ausgemessen und durch eine lineare Approximation im Elektronikteil des Referenzthermometers beschrieben. Der Sensor hat die Form einer Kugel mit einem Durchmesser von 1 mm. Der Leistungsumsatz im Sensor beträgt bei 5°C 29.75 µW und bei 60°C 41.16 µW. Dazwischen kann linear interpoliert werden [Kuhn 2000]. Für 25°C ergibt sich 33.9 µW und für 37°C ergibt sich 36.4 µW. Die Berechnung des thermischen Widerstandes der Lösung vom Sensor aus gesehen ergibt für den absorbanzmessenden Reader 91 K/W und für den fluoreszenzmessenden Reader 215 K/W. Damit liefert der Sensor im absorbanzmessenden Reader eine Temperaturüberhöhung im Referenzwell von 3.1 bzw. $3.3 \cdot 10^{-3}$ °C und im fluoreszenzmessenden Reader 7.3 bzw. $7.8 \cdot 10^{-3}$ °C. Die berechneten Überhöhungen sind deutlich kleiner als die Unsicherheiten der mit Hilfe der optischen Thermometer berechneten Welltemperatur, so daß sie praktisch nicht meßbar sind. Der Sensor des Referenzthermometers erwärmt die Lösung im Referenzwell nur unwesentlich.

Die Sensorzuleitung besteht aus zwei miteinander verdrehten Drähten mit einem Durchmesser von je 0.3 mm und einer Länge von 1 m. Sie werden in einer Länge von 6 cm im temperierten Luftvolumen an der Oberfläche der MTP geführt. Sollte hier eine Wärmeableitung erfolgen, müßte die mit Hilfe des optischen Thermometers gemessene Temperatur des Referenzwells systematisch zu tief gemessen werden, was ebenfalls nicht beobachtet wurde. Die Wärmeableitung durch die Sensorzuleitung ist damit vernachlässigbar. Das Messen der Lösungstemperatur wird als rückwirkungsfrei betrachtet.

Die Meßwerte des Referenzthermometers können digital in einen Rechner eingelesen werden.

2.4.4. Leistungsumsatz im Well durch die zum Messen benutzte Strahlung

Beide Reader liefern die Meßwerte mittels einer dem Wellinhalt zugeführten Strahlung. Deren über die Strahlquerschnittsfläche integrierte Leistungsdichte ist eine Leistung, die zumindest teilweise in der Lösung absorbiert wird. Dies führt zu einer ungewollten Temperatur-

erhöhung im Well. Die größte Erhöhung der Lösungstemperatur erhält man bei einer gedachten 100%-igen Absorption der Strahlung in der Lösung. Die dann im Well umgesetzte Leistung läßt sich mit Hilfe einer großflächigen Photodiode bestimmen, die anstelle des Wells angeordnet wird. Sie muß eine so große lichtempfindliche Fläche besitzen, daß auf sie die gesamte sonst der Lösung zugeführte Strahlung fällt. Im anderen Fall benötigt man Angaben über die Geometrie der Strahlquerschnittsfläche und über die ortsabhängige Leistungsdichte in ihr. Bei bekannter spektraler Empfindlichkeitskurve der Photodiode kann aus dem gemessenen Photostrom auf die einfallende Strahlungsleistung geschlossen werden. Im vorliegenden Fall wird das Spektrum der Strahlung durch schmalbandige Filter zwischen Lichtquelle und Lösung bestimmt. Damit kann eine für ein bestimmtes Filter konstante Empfindlichkeit der Photodiode angesetzt werden, und es genügt die Division des gemessenen Photostromes durch die Empfindlichkeit bei dieser Wellenlänge zur Bestimmung der einfallenden Strahlungsleistung. Die auf diese Weise ermittelten Daten sind in Tabelle 2.2 zusammengestellt.

Reader	Wellenlänge	Bandbreite bei 50% Transmission	Photostrom	Empfindlichkeit	Strahlungsleistung	Temperaturüberhöhung
absorbanz-messend, Typ 1400	570 nm	9 nm	0.5 μ A	0.37 A/W	1.4 μ W	$2.5 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$
	405 nm	7 nm	0.3 μ A	0.2 A/W	1.5 μ W	$2.7 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$
	620 nm	7 nm	0.5 μ A	0.45 A/W	1.1 μ W	$2.0 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$
fluoreszenz-messend, Fluoroskan II	405 nm	8 nm	1.5 μ A	0.2 A/W	7.5 μ W	$3.2 \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$
	450 nm	8 nm	1.3 μ A	0.25 A/W	5.2 μ W	$2.2 \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$

Tab. 2.2: Photoströme, Empfindlichkeiten, Strahlungsleistungen und Temperaturüberhöhungen im Well bei den für das optische Thermometer benutzten Wellenlängen in den Readern Typ 1400 und Fluoroskan II. Photodiode: SP103, Empfindlichkeiten aus [o.V. Optoelektronische Halbleiterbauelemente]. Filterdurchlaßkurven wurden mit einem Spektrophotometer Beckman UV-DU70 ermittelt. Thermische Widerstände der Lösung für die Meßstrahlung: absorbanzmessender Reader 182 K/W, fluoreszenzmessender Reader 430 K/W.

Die so gefundenen größtmöglichen Strahlungsleistungen im Well ergeben zusammen mit den für die Meßstrahlung wirksamen thermischen Widerständen der Lösung die in der letzten Spalte angegebenen Temperaturüberhöhungen. Sie liegen weit unterhalb der Unsicherheit der mit Hilfe der optischen Thermometer berechneten Welltemperatur, so daß sie praktisch nicht meßbar sind. Die Lösung wird von der zur Messung benutzten Strahlung bei beiden Readern nur unwesentlich erwärmt.

2.5. Das optische Thermometer im erweiterten Temperaturbereich bei Messung im absorbanzmessenden Reader

Der Einsatz des optischen Thermometers auf der Basis des TRIS-Kresolrot-Systems ist prinzipiell nicht auf den bisher verwendeten Temperaturbereich von $\approx 25 \dots \approx 40^\circ\text{C}$ beschränkt. Zur Untersuchung der Frage, ob es auch im erweiterten Temperaturbereich von $5 \dots 50^\circ\text{C}$ sinnvoll einsetzbar ist, wurde eine Kalibrierkurve im absorbanzmessenden Reader mit einer TRIS-Kresolrot-Lösung aufgenommen. Die folgende Abb. 2.10 zeigt das Ergebnis.

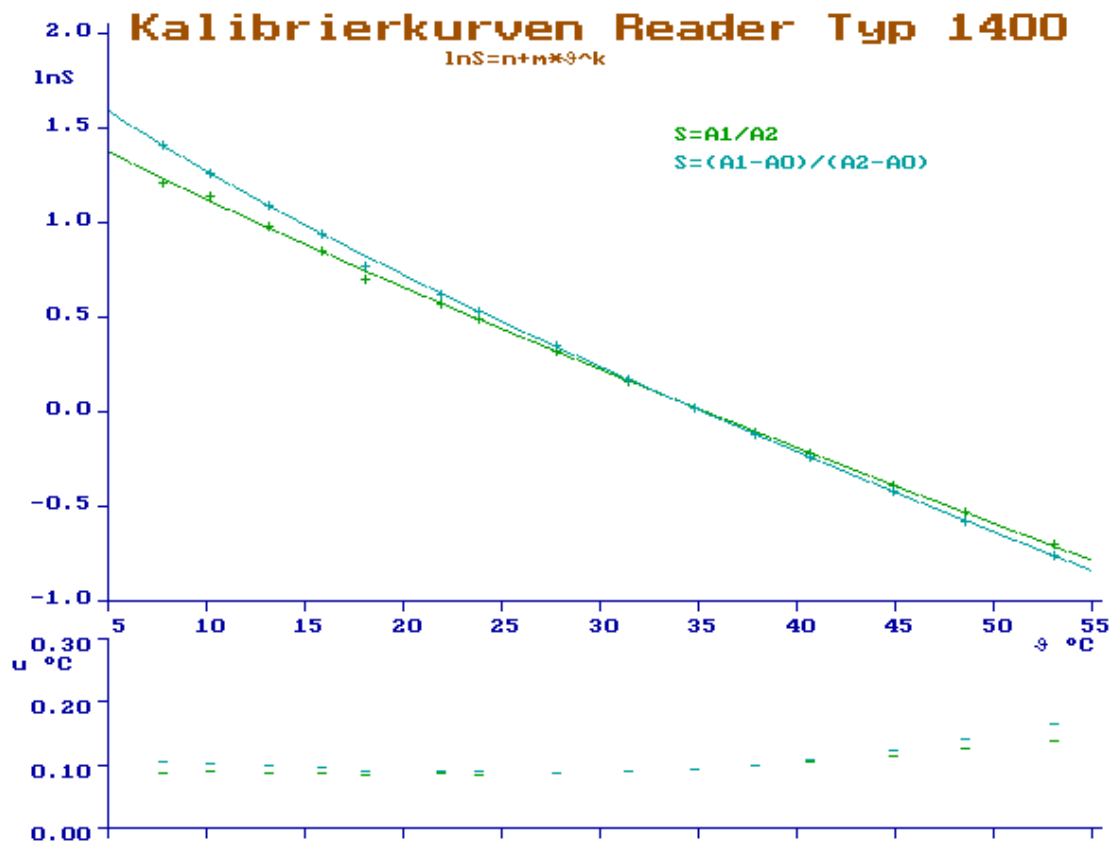


Abb. 2.10: oberes Diagramm: Kalibrierkurven im erweiterten Temperaturbereich $5 \dots 50^\circ\text{C}$ für zwei verschiedene Absorbanzfunktionen S nach den Gleichungen (2.1) und (2.2), aufgenommen mit einem absorbanzmessenden Reader Typ 1400, $250 \mu\text{l}$ $78 \mu\text{M}$ Kresolrot in 0.1 M TRIS $\text{pH}=7.89$ bei 20.6°C in Nunc-strips, ohne Folie, metallischer Heizkörper für Nunc-strips, Dachheizung 3°C wärmer als Heizkörper, Anfang bei kleinen Temperaturen, Anfangstemperatur durch Abkühlen in einem Kühlraum, $A1 \equiv A_{570 \text{ nm}}$, $A2 \equiv A_{405 \text{ nm}}$, $A0 \equiv A_{620 \text{ nm}}$; unteres Diagramm: Unsicherheit u der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur θ unter Berücksichtigung nur der zufälligen Fehler von $A1$, $A2$ und $A0$ des absorbanzmessenden Readers, ebenfalls für S nach den Gleichungen (2.1) und (2.2).

Das obere Diagramm in Abb. 2.10 zeigt die aus einer Kalibrierprozedur ermittelbaren zwei Kalibrierkurven; je nach Wahl der Absorbanzfunktion nach den Gleichungen (2.1) und (2.2).

Das untere Diagramm in Abb. 2.10 zeigt die zu erwartende temperaturabhängige Unsicherheit u der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur θ unter Berücksichtigung nur der zufälligen Fehler der Absorbanzmeßwerte wieder für beide Absorbanzfunktionen nach den Gleichungen (2.1) und (2.2). Man erkennt, daß die Unsicherheit u für beide

Absorbanzfunktionen etwa 0.1°C beträgt. Zur Berechnung der Unsicherheit u wird zunächst die empirische Standardabweichung $s_{\ln S}$ wie folgt ermittelt:

Es wird die Empfindlichkeit $d\ln S/dA_\lambda$ mit $\lambda=570$ nm, 405 nm und 620 nm der Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.2) durch Entwicklung in eine Taylorreihe mit Abbruch nach dem linearen Glied ermittelt. Nach unkorrelierter Überlagerung aller drei Anteile entsteht Gleichung (2.14) für $s_{\ln S}$:

$$s_{\ln S}^2 = \left(\frac{1}{A_1 - A_0} \right)^2 \cdot s_{A_1}^2 + \left(\frac{-1}{A_2 - A_0} \right)^2 \cdot s_{A_2}^2 + \left(\frac{1}{A_2 - A_0} - \frac{1}{A_1 - A_0} \right)^2 \cdot s_{A_0}^2 \quad (2.14)$$

Dabei ist $A_1 \equiv A_{570\text{nm}}$, $A_2 \equiv A_{405\text{nm}}$ und $A_0 \equiv A_{620\text{nm}}$. Die Größen s_{A_1} , s_{A_2} , und s_{A_0} sind die empirischen Standardabweichungen der Absorbanzmeßwerte des Readers und wurden [o.V. Operation manual absorbanzmessender Reader S.5] entnommen. Die Umrechnung von $s_{\ln S}$ in eine Temperaturunsicherheit u geschieht mit Hilfe der Steilheit $d\ln S/d\vartheta$ der Kalibrierkurve nach Gleichung (2.3):

$$u = s_{\ln S} / |d\ln S/d\vartheta| \quad (2.15).$$

Die entsprechenden Zahlen für die Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.1) ergeben sich aus der Gleichung (2.14), indem $A_0=0$ und $s_{A_0}=0$ gesetzt wird. Zum Vergleich werden die für die Unsicherheit u wichtigen Daten $s_{\ln S}$ und $d\ln S/d\vartheta$ beider Reader in der Tabelle 2.3 zusammengefaßt.

Reader	340 ATTC (Raumtemperatur)			Typ 1400 (27.77°C)		
Absorbanzfunktion	$s_{\ln S}$	$d\ln S/d\vartheta$	u	$s_{\ln S}$	$d\ln S/d\vartheta$	u
S nach Gl. (2.1)	0.0015	-0.0366/°C	0.041°C	0.0037	-0.0427/°C	0.087°C
S nach Gl. (2.2)	0.0016	-0.0411/°C	0.039°C	0.0041	-0.0473/°C	0.088°C

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der Daten $s_{\ln S}$, $d\ln S/d\vartheta$ und u für die MTP-Reader 340 ATTC und Typ 1400. Daten der Spalte 340 ATTC stammen aus [Schilling u.a. 1993/2 Tab. 1 und 2]. Daten der Spalte Typ 1400 stammen aus den Daten zu Abb. 2.10. Dort liegt das Minimum von u für S nach Gleichung (2.2) bei 27.77°C. Beim 340 ATTC ist $A_2 \equiv A_{450\text{nm}}$.

Tabelle 2.4 zeigt die mit [Cumme 1992] ermittelten Parameter n, m, k aus der Gleichung (2.3) für die beiden Kalibrierkurven nach Abb. 2.10, oberes Diagramm. Diese Parameter müssen für jede neu hergestellte TRIS-Kresolrot-Lösung neu ermittelt werden, weil es nicht gelingt, den Puffer-pH-Wert bei einer gegebenen Temperatur exakt auf einen gewünschten Wert einzustellen. Die Parameter n, m, k dienen unter Berücksichtigung der Absorbanzfunktion nach den Gleichungen (2.1) oder (2.2) der Berechnung der Lösungstemperatur mittels Gleichung (2.3).

Parameter	Absorbanzfunktion S nach Gleichung (2.1)	Absorbanzfunktion S nach Gleichung (2.2)
n	1.692524	2.066772
m	-0.079713	-0.140222
k	0.857281	0.755875

Tabelle 2.4: Parameter n,m,k aus Gleichung (2.3) für die Kalibrierkurven nach Abb. 2.10, oberes Diagramm, ermittelt mit [Cumme 1992]

Nach Aufnahme der Kalibrierkurven (Abb. 2.10, oberes Diagramm) ergeben sich zwei Funktionen mit einer nur schwachen Krümmung. Das bedeutet, daß die Meßempfindlichkeit am unteren Ende des erweiterten Temperaturbereichs bei 5°C nicht wesentlich geringer ist als am oberen bei 50°C. Dieser geringe Unterschied drückt sich im unteren Diagramm von Abb. 2.10 durch die bei 50°C etwas höhere Unsicherheit u der mittels des optischen Thermometers berechneten Temperatur ϑ aus. Weiterhin geht die Steilheit der Kalibrierkurve in die Unsicherheit u der berechneten Temperatur ein. Je steiler sie in Abb. 2.10 verläuft, um so sicherer ist die berechnete Temperatur bei gleicher empirischer Standardabweichung $s_{\ln S}$ der Absorbanzfunktion S . Beide Kalibrierkurven schneiden sich bei $\ln S=0$, weil beide Absorbanzfunktionen nach den Gleichungen (2.1) und (2.2) für $A_{570\text{ nm}}=A_{405\text{ nm}}$ den gleichen Wert $\ln S$ unabhängig von $A_{620\text{ nm}}$ liefern.

Alle Absorbanzmeßwerte A haben einen konstanten Anteil, den Blindwert. Dieser rührt von der Wellbodenabsorbanz her. Die Subtraktion des Meßwertes $A_{620\text{ nm}}$ entsprechend Gleichung (2.2) führt zu einer Absorbanzdifferenz. Der Zweck besteht in der Verringerung des temperaturunabhängigen Anteils, um die Meßempfindlichkeit, also die Steilheit der Kalibrierkurve, zu erhöhen.

Die Unsicherheit der mittels der Absorbanzfunktion Gleichung (2.2) berechneten Temperatur im unteren Diagramm von Abb. 2.10 ist größer als die Unsicherheit der berechneten Temperatur nach Gleichung (2.1). Das liegt an der bei Rechnung nach Gleichung (2.1) entfallenden Meßwertunsicherheit der Absorbanzmeßwerte $A_{620\text{ nm}}$. Bei mittleren Temperaturen ($\ln S \approx 0$, d.h. $A_{570\text{ nm}} \approx A_{405\text{ nm}}$) ist die Unsicherheit nach Gleichung (2.2) dagegen praktisch genau so groß wie die nach Gleichung (2.1) berechnete. Exakt bei $\ln S=0$ geht die partielle Ableitung der Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.2) $\partial \ln S / \partial A_0$ durch Null, so daß bei mittleren Temperaturen die Meßwertunsicherheit der Absorbanzmeßwerte $A_{620\text{ nm}}$ nach Gleichung (2.14) praktisch entfällt. Ein Vergleich der 3. und 4. Zeile von Tabelle 2.3 zeigt, daß die empirische Standardabweichung $s_{\ln S}$ nach Gleichung (2.2) größer als die nach Gleichung (2.1) ist. Die in diesem Bereich für den Reader 340ATTC niedrigere Unsicherheit der Temperatur nach Gleichung (2.2) ist nun auf den steileren Verlauf der Kalibrierkurve nach Gleichung (2.2) im Vergleich zu Gleichung (2.1) zurückzuführen. Die nach Gleichung (2.2) für $A_{570\text{ nm}}=A_{405\text{ nm}}=A$ um den Faktor $A/(A-A_{620\text{ nm}})$ größeren Beträge der partiellen Ableitungen

$\partial \ln S / \partial A_{570 \text{ nm}}$ und $\partial \ln S / \partial A_{405 \text{ nm}}$ können der niedrigeren Unsicherheit der Temperatur nach Gleichung (2.2) nur entgegenwirken, sie aber nicht größer werden lassen als durch Gleichung (2.1) bedingt (Rechnung nicht aufgeführt). Beim Reader 340 ATTC ist die empirische Standardabweichung $s_{\ln S}$ bei der Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.2) nur geringfügig größer als nach Gleichung (2.1), s. Tabelle 2.3, Spalte 340 ATTC. Zusammen mit einer größeren und temperaturunabhängigen Steilheit $d \ln S / dT$ der Kalibrierkurve ergibt sich im Bereich $A_{570 \text{ nm}} \approx A_{405 \text{ nm}}$ eine niedrigere Unsicherheit u der Temperatur.

Für den Reader Typ 1400, ebenfalls Tabelle 2.3, wurden etwas andere Ergebnisse ermittelt: Die empirische Standardabweichung $s_{\ln S}$ bei der Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.2) ist merklich größer als nach Gleichung (2.1). Die Steilheit $d \ln S / dT$ der Kalibrierkurve nach Gleichung (2.3) ist temperaturabhängig. Für die Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.1) ergibt sich kein eindeutiges Minimum in u , für Gleichung (2.2) liegt das Minimum von u im Bereich $A_{570 \text{ nm}} / A_{405 \text{ nm}} \approx 1.4$ entspr. den gewählten 27.77°C aus Tabelle 2.3. Das Minimum liegt also weitab vom Bereich $A_{570 \text{ nm}} / A_{405 \text{ nm}} \approx 1$, in dem der durch $s_{A_{620 \text{ nm}}}$ beeinflusste Term in Gleichung (2.14) entfällt. Die Ursache liegt in der Abhängigkeit der empirischen Standardabweichung eines Absorbanzmeßwertes von seinem Mittelwert. Zur Beantwortung der Frage nach dem optimalen Meßbereich für den Reader Typ 1400 wurde der Verlauf der temperaturabhängigen Unsicherheit mit geglätteten Meßwerten untersucht:

Die in Abb. 2.10 gezeigte Kalibrier- und Fehlerkurve wurde auf Grundlage der Absorbanzmeßwerte des Referenzwells ermittelt. Dabei sind Meßwertschwankungen unvermeidlich. Zu deren Elimination sind die temperaturabhängigen Absorbanzen durch eine Parabel für $\lambda = 570 \text{ nm}$ sowie durch zwei Geraden für $\lambda = 405 \text{ nm}$ und $\lambda = 620 \text{ nm}$ approximiert worden (Bilder nicht dargestellt).

Zusammen mit der absorbanzabhängigen empirischen Standardabweichung eines Absorbanzmeßwertes des Readers Typ 1400 ergibt sich eine im Vergleich zu Abb. 2.10 glattere, sonst aber gleiche Fehlerkurve für u (ebenfalls nicht dargestellt). Für die Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.1) ergibt sich ein nur sehr schwach ausgeprägtes lokales Minimum von 0.089°C bei $A_{570 \text{ nm}} / A_{405 \text{ nm}} \approx 1.5$ entspr. 26°C , dicht neben einem ebenfalls sehr schwach ausgeprägten lokalen Maximum von 0.081°C bei $A_{570 \text{ nm}} / A_{405 \text{ nm}} \approx 1.7$ entspr. 23°C . Unter 23°C fällt die Kurve flach ab, über 26°C steigt sie stärker. Die minimale Unsicherheit u erreicht man mit S nach Gleichung (2.1) bei der Messung möglichst kleiner Temperaturen (0.074°C bei 5°C), die maximale bei der Messung hoher Temperaturen (0.120°C bei 50°C).

Die Absorbanzfunktion nach Gleichung (2.2) liefert ein globales ($5 \dots 50^\circ\text{C}$) Minimum der Unsicherheit u von 0.089°C bei $A_{570 \text{ nm}} / A_{405 \text{ nm}} \approx 1.5$ entspr. 27°C . Ein lokales Maximum von 0.10°C liegt bei $A_{570 \text{ nm}} / A_{405 \text{ nm}} \approx 3.5$ entspr. 10°C . Bei 5 und 50°C beträgt die Unsicherheit 0.096°C bzw. 0.139°C . Damit liegt der optimale Meßbereich des Readers Typ 1400 bei etwa 27°C . Die Unsicherheit u ist im Gegensatz zum Reader 340 ATTC im Bereich der hier ge-

messenen Temperaturen immer größer als die nach Gleichung (2.1). Eine im Bereich $A_{570\text{nm}}/A_{405\text{nm}} \approx 1$ niedrigere Unsicherheit u tritt nicht auf.

Die qualitativen Unterschiede des Verlaufs der Temperaturunsicherheit sind auf die verschieden angesetzten Approximationen der Kalibrierkurven zurückzuführen (Gleichung (2.1) oder (2.2)), die quantitativen auf die readerabhängige empirische Standardabweichung einer einzelnen Absorbanzmessung.

Der Reader Typ 1400 liefert eine Unsicherheit der Temperatur von $u \approx 0.1^\circ\text{C}$, der Reader 340 ATTC dagegen nur $u \approx 0.04^\circ\text{C}$. Die Ursache liegt in der geringeren empirischen Standardabweichung s_A einer Absorbanzmessung des Readers 340 ATTC. Die Hinzunahme einer dritten Wellenlänge von 620 nm bringt nach Tabelle 2.3 beim Reader 340 ATTC eine nur geringfügige Verringerung der Unsicherheit der Temperatur, beim Reader Typ 1400 eine sehr geringe Erhöhung. Trotz dessen größerer Unsicherheiten sind weitergehende Untersuchungen am Reader Typ 1400 durchgeführt worden, weil er günstige Platzverhältnisse für den Einbau eines geänderten Temperiersystems geboten hat.

2.6. Messung während des Aufheizens

Die Messung der Temperaturverteilung während des Aufheizens der Multiküvette ist systembedingt fehlerbehaftet. Es treten mindestens die folgenden Fehlereinflüsse auf:

- Gradientenbildung infolge Messens während des Aufheizens: Während der für eine MTP benötigten Meßdauer t_M wird die Multiküvette weiter geheizt. Die zuletzt gemessene MTP-Spalte beim Typ 1400 bzw. das zuletzt gemessene Well beim Fluoroskan II weisen im Vergleich zu ihren Anfangstemperaturen die größte Temperaturdifferenz auf. Daraus lassen sich ein scheinbarer Gradient über die MTP und eine scheinbare Inhomogenität berechnen. Beim Reader Typ 1400 sind beide Werte sehr klein, weil die Meßdauer t_M sehr gering ist. Beim Fluoroskan II ist die Meßdauer t_M so groß, daß innerhalb dieser Zeit die Lösungstemperatur bereits in die Nähe der gewünschten Endtemperatur gelangt ist. Man kann also während der Aufheizphase nicht eine linear steigende Lösungstemperatur wie beim Reader Typ 1400 voraussetzen. Die Bedeutung wird in der Auswertung zu Gleichung (2.19) erklärt. Auf der MTP wirkt während der Meßdauer t_M die gesamte Temperaturdifferenz zwischen Anfangs- und Endtemperatur, hier 13°C . Man erhält einen sehr großen Gradienten und eine schlechte Homogenität.

- Messung bei mehr als einer Wellenlänge: Da bei beiden optischen Thermometern mehr als eine Wellenlänge zum Erhalt eines Meßwertes benötigt wird, muß entsprechend oft nacheinander gemessen werden. In diesem Fall ist deshalb der zeitliche Abstand zweier Messungen desselben Wells, die Wiederholzeit t_w , zu berücksichtigen. Die Meßzeitpunkte desselben Wells bei zwei Wellenlängen liegen um die Wiederholzeit t_w auseinander. Die Messung bei der zweiten Wellenlänge findet wärmere Wells vor. Beim Reader Typ 1400 ist

der so mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperaturfehler deutlich kleiner als beim Fluoroskan II. Im Ergebnis wird von beiden Temperaturberechnungsverfahren eine Welltemperatur ermittelt, die zwischen den Welltemperaturen zu den Zeitpunkten der Messungen der ersten und der letzten Wellenlänge liegt.

Tabelle 2.5 zeigt die durch die eben beschriebenen Effekte verursachten Temperaturdifferenzen. Die dort dargestellten Fehler und die Berechnung bzw. Messung ihrer Größe sind systematischer Natur und beruhen allein auf dem Zugrundelegen des Prinzips der Temperaturbestimmung. Zufällige Fehler wurden nicht berücksichtigt.

Desweiteren muß beachtet werden, daß der Vorgang der Wärmeleitung von der Multiküvette in die Lösung in der Aufheizphase nicht abgeschlossen ist. Die Lösungstemperatur in Abhängigkeit von der Temperatur der Multiküvette läßt sich durch einen Tiefpaß 1. Ordnung beschreiben. Es gilt Gleichung (4.11) für den Reader Typ 1400 sowie

$$\tau_1 = 40 \text{ s} \quad (2.16)$$

für den Fluoroskan II bei einem Lösungsvolumen $V=130 \mu\text{l}$. Wird dieses System mit einer steigenden Eingangsgröße, der Temperatur der Multiküvette, beaufschlagt, kann die Ausgangsgröße, die Lösungstemperatur, der Eingangsgröße nur mit einer gewissen Differenz folgen. Die steigende Eingangsgröße liegt für die Aufheizzeit an. Diese liegt in der Größenordnung der Lösungszeitkonstanten nach den Gleichungen (2.16) und (4.11). Damit ist der Übergangsvorgang erst nach $4 \dots 5 \cdot \tau_1$ abgeschlossen.

Parameter	Typ 1400	Fluoroskan II
Aufheizgeschwindigkeit der Lösung	0.175°C/s	$\leq 0.6^\circ\text{C/s}$ (zeitabhängig)
Meßdauer t_M	1.5 s	62 s
Wiederholzeit t_W	8 s	120 s
Gradient durch Aufheizen beim Messen	$(0.175^\circ\text{C/s}) \cdot 11/12 \dots$ $\dots \cdot 1.5 \text{ s} \approx 0.24^\circ\text{C}$	Endtemp.- Anf.temp.= 13°C
Homogenität	0.08°C	3.4°C
Temperaturfehler bei Mehr-Wellenlängen-Messung	mit Gl. (2.1): +0.27°C mit Gl. (2.2): +0.34°C	mit Gl. (2.4): +12°C

Tabelle 2.5: gemessene Aufheizgeschwindigkeit im Well E7, Meßdauer, Wiederholzeit, berechneter Gradient, berechnete Homogenität und berechneter Temperaturfehler in der Aufheizphase bei den Readern Typ 1400 ($V=250 \mu\text{l}$, Heizleistung $P=87.3 \text{ W}$ nach Gleichung (4.2)) und Fluoroskan II ($V=130 \mu\text{l}$, Heizleistung $P=200 \text{ W}$)

Sind zum Erhalt eines Meßwertes Messungen bei mehr als einer Wellenlänge erforderlich, können diese nur nacheinander erfolgen, denn die hier behandelten Readertypen können

nur eine Wellenlänge gleichzeitig messen. Deshalb weist die Temperaturbestimmung mit Hilfe der aufeinanderfolgenden Messung bei verschiedenen Wellenlängen einen systematischen Fehler auf (Tabelle 2.5, Zeile Temperaturfehler bei Mehr-Wellenlängenmessung): Sei ϑ die gesuchte Temperatur und durch eine Funktion $\vartheta(M_{\lambda 1}(t), \dots, M_{\lambda n}(t))$ mit den Meßwerten $M_{\lambda i}(t)$ verbunden, dann ist die tatsächliche Temperatur ϑ_{wahr} , berechnet aus den gleichzeitig zur Zeit t_0 gemessenen Meßwerten $M_{\lambda i}(t_0)$

$$\vartheta_{\text{wahr}} = \vartheta(M_{\lambda 1}(t_0), \dots, M_{\lambda n}(t_0)) \quad (2.17).$$

Die Meßwerte $M_{\lambda i}(t_0)$ aus Gleichung (2.17) können aber zum Zeitpunkt t_0 nicht alle gleichzeitig gemessen werden. Also werden sie nacheinander im Abstand der Wiederholzeit t_w gemessen. Damit ergibt sich die berechnete Temperatur ϑ_{ber} zu

$$\vartheta_{\text{ber}} = \vartheta(M_{\lambda 1}(t_0), M_{\lambda 2}(t_0 + t_w), \dots, M_{\lambda n}(t_0 + (n-1) \cdot t_w)) \quad (2.18).$$

Der systematische Fehler der nach Gleichung (2.18) berechneten Temperatur ϑ_{ber} gegenüber der tatsächlichen Temperatur ϑ_{wahr} nach Gleichung (2.17) zum Zeitpunkt t_0 beträgt etwa

$$\Delta\vartheta \approx \sum_{i=1}^n \frac{\partial\vartheta}{\partial M_{\lambda i}} \cdot \frac{dM_{\lambda i}}{dt} \cdot (i-1) \cdot t_w \quad (2.19).$$

Dieser Ausdruck kann verwendet werden, um den Fehler von ϑ_{ber} in Gleichung (2.18) infolge der aufeinanderfolgenden Messung bei verschiedenen Wellenlängen herauszurechnen. Für einen geringen Fehler $\Delta\vartheta$ muß $|\Delta\vartheta|$ nach Gleichung (2.19) möglichst klein werden. Daraus folgt:

- Haben alle Produkte $(\partial\vartheta/\partial M_{\lambda i}) \cdot (dM_{\lambda i}/dt)$ das gleiche Vorzeichen, gilt: Die Wellenlänge λ_i , die das dem Betrag nach größte Produkt $(\partial\vartheta/\partial M_{\lambda i}) \cdot (dM_{\lambda i}/dt)$ liefert, muß zu dem Zeitpunkt gemessen werden, zu dem die Temperatur ϑ gesucht ist. Die Messungen bei den anderen Wellenlängen erfolgen in der Reihenfolge des Betrages der Ableitungen $(\partial\vartheta/\partial M_{\lambda i}) \cdot (dM_{\lambda i}/dt)$. Sind die Vorzeichen nicht alle gleich, muß die Reihenfolge der Messungen so gewählt werden, daß der Fehler $|\Delta\vartheta|$ aus Gleichung (2.19) ein Minimum wird. Aus diesem Ansatz ergibt sich die notwendige Reihenfolge der Messung bei verschiedenen Wellenlängen. Da die Temperaturänderung gleichmäßig auf alle Meßwerte $M_{\lambda i}$ wirkt, haben die Produkte immer das gleiche Vorzeichen. In Tabelle 2.6 sind die Produkte und ihre beiden Faktoren für beide Reader zusammengefaßt dargestellt.

Reader		λ	$\partial\vartheta/\partial M_{\lambda i}$	$dM_{\lambda i}/dt$	$(\partial\vartheta/\partial M_{\lambda i}) \cdot (dM_{\lambda i}/dt)$
Typ 1400	S nach Gleichung (2.1)	570 nm	-26.1°C	-0.00528/s	0.138°C/s
		405 nm	32.5°C	0.00103/s	0.033°C/s
	S nach Gleichung (2.2)	570 nm	-27.2°C	-0.00528/s	0.143°C/s
		405 nm	35.1°C	0.00103/s	0.036°C/s
		620 nm	-7.86°C	-0.00046/s	0.004°C/s
Fluoroskan II	p nach Gleichung (2.4)	405 nm	0.205°C	0.823/s	0.169°C/s
		450 nm	-0.049°C	-7.28/s	0.357°C/s

Tabelle 2.6: berechnete Produkte $(\partial\vartheta/\partial M_{\lambda i}) \cdot (dM_{\lambda i}/dt)$ und ihre Faktoren unter Zuhilfenahme der Aufheizgeschwindigkeit aus Tabelle 2.5. Beim Reader Typ 1400 ist M ein Absorbanzmeßwert, beim Fluoroskan II ein Fluoreszenzmeßwert.

Aus der Reihenfolge der Produktbeträge in der letzten Spalte von Tabelle 2.6 geht hervor, daß die mit Hilfe des optischen Thermometers ermittelte Temperatur beim Reader Typ 1400 maßgeblich von der Messung mit 570 nm bzw. beim Fluoroskan II von der Messung mit 450 nm abhängt.

- Ist die anfangs genannte Linearitätsbedingung der Lösungstemperatur erfüllt, kann mit ihrer Hilfe der Fehler nach Gleichung (2.19) ermittelt werden, indem der zum Zeitpunkt $i=2$ erhaltene Meßwert $M_{\lambda 2}(t_0+t_w)$ mittels seiner konstanten Änderungsgeschwindigkeit auf den Zeitpunkt $i=1$ zurückgerechnet wird.
- Die Wiederholzeit t_w muß möglichst klein sein. Sie ist durch Geräteparameter und notwendige Bedienhandlungen nach unten begrenzt.

Aus den Ergebnissen der Betrachtung der Dynamik des Aufheizvorganges der Lösung in den Multiküvetten der Reader Typ 1400 und Fluoroskan II sind wichtige Schlußfolgerungen zu ziehen:

- Der Reader Typ 1400 mißt schnell genug, um im Zusammenhang mit der gegebenen Aufheizgeschwindigkeit der Lösung beim Messen während des Aufheizens Meßwerte zu liefern, die eine Beurteilung des Temperaturverlaufes in jedem Well beim Aufheizen gestatten. Die berechnete Homogenität ist so gut, daß die gemessene schlechtere Homogenität von anderen Ursachen herrühren muß. Fordert man mit Gleichung (2.1) einen Temperaturmeßfehler von $<0.1^\circ\text{C}$ für ein einziges Well, muß die Aufheizgeschwindigkeit der Lösung kleiner als 0.066°C/s sein. Darauf haben die Aufheizgeschwindigkeit der Lösung und die Meßzeit t_M aus Tabelle 2.5 sowie das Produkt $(\partial\vartheta/\partial M_{405\text{nm}}) \cdot (dM_{405\text{nm}}/dt)$ aus Tabelle 2.6 einen Einfluß. Gilt die gleiche Forderung für die gesamte MTP, beträgt die maximale Aufheizgeschwindigkeit 0.056°C/s . Mit Gleichung (2.2) ergeben sich die Werte 0.050°C/s bzw. 0.042°C/s (Rechnung nicht aufgeführt). Diese Aufheizgeschwindigkeiten sind so klein, daß die eingangs gestellte Forderung nach schnellem Aufheizen nicht mehr erfüllt werden kann.

- Der Reader Fluoroskan II erfordert aufgrund seiner Konstruktion eine im Vergleich zum Typ 1400 hohe Meßdauer. Zusätzlich ist die Aufheizgeschwindigkeit der Lösung größer. Deshalb gestatten die Meßwerte dieses Readers weder eine Aussage über den Temperaturverlauf noch über die Homogenität während des Aufheizens. Es ist erforderlich, bei der Messung der Temperaturverteilung den thermischen Ausgleich abzuwarten. Fordert man wieder einen Temperaturmeßfehler von $<0.1^{\circ}\text{C}$ für ein einziges Well, muß die Aufheizgeschwindigkeit der Lösung kleiner als 0.003°C/s sein. Gilt die gleiche Forderung für die gesamte MTP, beträgt die maximale Aufheizgeschwindigkeit 0.002°C/s (analoges Vorgehen, Rechnungen nicht aufgeführt). Hier entstehen extrem kleine Werte aufgrund der sehr großen Meßzeit t_M und Wiederholzeit t_W . Die Forderung nach schnellem Aufheizen wird noch viel weniger erfüllt als beim absorbanzmessenden Reader.
- Bei der Ermittlung der Kalibrierkurven soll zwischen dem Beginn des Aufheizvorganges auf die nächsthöhere Temperatur und dem Beginn der dazugehörigen Messung wenigstens eine Zeit von $4 \dots 5 \cdot \tau_1$ mit τ_1 entspr. den Gleichungen (2.16) bzw. (4.11) liegen. Am Ende dieser Zeit hat die Lösungstemperatur praktisch ihren stationären Endzustand erreicht. Der thermische Ausgleich hat stattgefunden.
- Aufgrund der benötigten Meßdauer für eine MTP wird beim Aufheizen ein tatsächlich nicht vorhandener Gradient in Fahrtrichtung angezeigt. So erhaltene Ergebnisse sind nicht ohne weiteres verwendbar.
- Temperaturen, die während des Aufheizvorganges ermittelt wurden, werden wegen der aufeinanderfolgenden Messungen bei mehreren Wellenlängen im Vergleich zur Messung bei der ersten Wellenlänge zu hoch berechnet. Dieser Fehler kann durch die Wahl der Reihenfolge der Messungen minimiert werden.

3. Untersuchung verschiedener Heizverfahren

Die Aufgabe des gesuchten Heizverfahrens besteht in einer schnellen und homogenen Temperierung der zu untersuchenden Lösung in einer 96-Well-MTP. Dazu muß ein starker und möglichst gleichmäßiger Energieeintrag in jedem Well realisiert werden.

Die in der Biochemie und medizinischen Labors benutzten und untersuchten Lösungen sind so niedrig konzentriert, daß die unter dem Aspekt Wärmeeintrag und Wärmeleitung interessanten physikalischen Eigenschaften Dielektrizität, Permeabilität, Dichte, Wärmeleitfähigkeit, spezifische Wärmekapazität und Viskosität der wäßrigen Lösung durch das Lösungsmittel Wasser bestimmt werden und nicht durch den gelösten Stoff. Der spezifische elektrische Leitwert der wäßrigen Lösung ist dagegen vom gelösten Stoff abhängig. Das Absorptionsspektrum hängt im sichtbaren Bereich vom gelösten Stoff ab und im IR-Bereich bei den hier verwendeten Lichtwegen von 3 bis 7.3 mm praktisch nur vom Wasser selbst. Entsprechend dieser Eigenschaften der zu untersuchenden Lösung erscheinen folgende Verfahren erfolgversprechend: indirekte Widerstandserwärmung, Erwärmung durch IR-Strahlung und dielektrische Erwärmung.

3.1. indirekte Widerstandserwärmung

3.1.1. absorbanzmessender Reader

Für erste grundsätzliche Untersuchungen zu den Eigenschaften eines Temperiersystems auf Basis eines indirekt widerstandsbeheizten Körpers wurde der absorbanzmessende Reader Typ 1400 benutzt. Die Originalkonstruktion wurde durch einen mit innenliegenden Kupferleiterbahnen erwärmbaren formschlüssigen Heizkörper aus Aluminium sowie einer die MTP in alle Richtungen überragenden nach oben thermisch isolierten Dachheizung 3 mm über der Welloberkante ersetzt. Abb. 3.1 zeigt die so modifizierte Temperiereinheit. Die Dachheizung wurde eingesetzt, um die Wärmeableitung vor allem der Randwells in den Reader gering zu halten und ein Beschlagen der Detektoroptik zu verhindern. Dieser Aufbau diente dem Ermitteln der benötigten Leistungen im Heizkörper und in der Dachheizung. Vom Heizkörper geht ein Wärmefluß in Richtung der kälteren Umgebung im Reader aus. Weiterhin tritt Verdunstung der Lösung in den Wells auf. Dadurch entstehen Temperaturgradienten in der MTP. Die äußeren Wells sind sowohl von der Wärmeableitung als auch von der Verdunstung stärker betroffen, weil deren verdunstete Flüssigkeit wenigstens teilweise nach außen abziehen kann, während die verdunstete Flüssigkeit der inneren Wells im Luftvolumen zwischen Oberkante der MTP und Unterkante der Dachheizung auf die verdunstete Flüssigkeit der äußeren Wells trifft und so ein gewisser Stau beim Abziehen nach außen entsteht. Der Wärmeableitung nach außen und der Verdunstung wurden durch eine Verschäumung der vier Heizkörper-Seitenflächen mit Kunststoff entgegengewirkt.

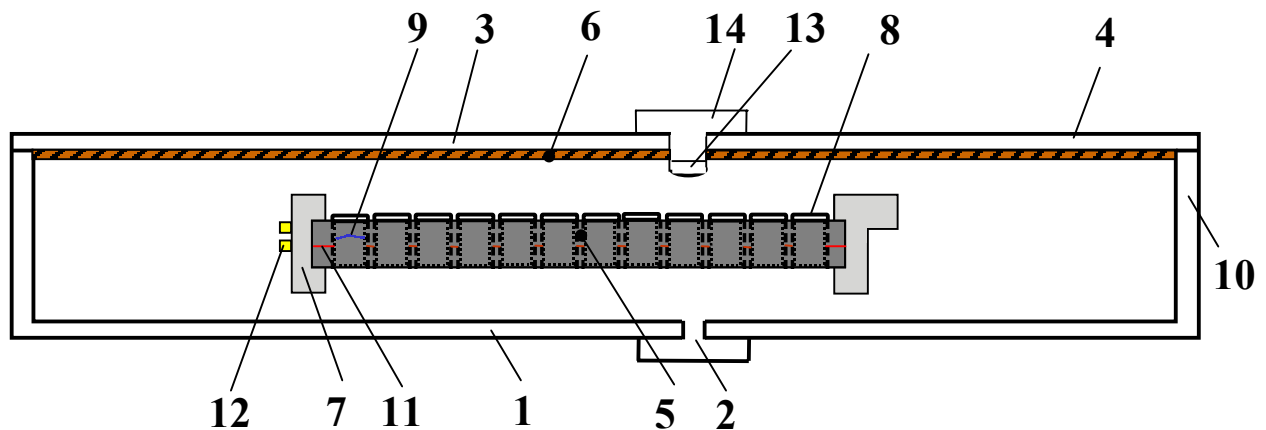


Abb. 3.1: Querschnitt durch die modifizierte Inkubationskammer eines temperierbaren absorbanzmessenden MTP-Readers vom Typ 1400; 1-Bodenplatte, 2-Sendeoptik, 3-Deckplatte, 4-Dachheizung, 5-Temperatursensor der beheizbaren Multiküvette, 6-Temperatursensor der Dachheizung, 7-thermische Isolierung der beheizbaren Multiküvette, 8-strips (1 strip=8 Wells), 9-Wellinhalt, 10-Klappe zum Verschließen des Schachtes, 11-elektrisch isolierte Heizleiter, 12-elektrische Anschlüsse für Heizstrom und Temperatursensor, 13-Detektoroptik, 14-Detektorbaugruppe; Seitenwände, Transportmechanismus und integrierten Schüttler nicht gezeichnet

Die Verdunstung selbst entzieht der Lösung Wärme und kühlt sie so oben ab. Zur Berechnung des Temperaturverlustes durch Verdunstung wurde zunächst die Verdunstungsgeschwindigkeit von Wasser ermittelt. Mit 250 µl Aqua dest in Greiner F-MTP beträgt der Masseverlust in allen 96 Wells im Reader Typ 1400 bei 24.5°C 0.885 g nach 30h25min und bei 37°C 0.765 g nach 4h48min. Daraus folgt mittels Division des Masseverlustes durch die Zeit und durch die Gesamtoberfläche der Lösung von $96 \cdot 33 \text{ mm}^2$ eine mittlere Verdunstungsgeschwindigkeit von $2.56 \cdot 10^{-9} \text{ g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{s})$ bzw. $0.3 \text{ µl}/(\text{Well} \cdot \text{h})$ bei 24.5°C und von $1.40 \cdot 10^{-8} \text{ g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{s})$ bzw. $1.7 \text{ µl}/(\text{Well} \cdot \text{h})$ bei 37°C. Aus dem Produkt der Verdunstungsgeschwindigkeit bei 37°C, der Verdampfungswärme von 539 cal/g [Römpf 1992 S.4993] und der Gesamtoberfläche der Lösung ergibt sich ein Leistungsanteil von 0.1 W, der nur dem Ausgleich der durch Verdunstung entzogenen Wärme bei 37°C Lösungstemperatur dient. Die Verdunstungsgeschwindigkeit erhöht sich deutlich bei frei zugänglicher MTP-Oberfläche: bei Raumtemperatur auf das Neunfache, bei 37°C auf das Sechsfache, nach [Weigand 2001] bei 37°C auf das Vierfache. Diese Zunahme liegt unter sonst gleichen Bedingungen an dem nur geringen Luftvolumen zwischen MTP und Dachheizung im Reader. Der Wasserdampf kann nur zur Seite abziehen. Das geringe Luftvolumen wird schnell gesättigt.

Wenn kein Energienachschub durch den Regler erfolgt, sinkt die durchschnittliche Wassertemperatur. Es stellt sich ein vertikaler Gradient ein. Die Lösungsoberfläche kühlt ab, und Wärme wird aus den tieferen Bereichen des Wells nach oben geleitet. Zur Berechnung des durchschnittlichen Temperaturverlustes dient die Grundgleichung der Wärmelehre $W = m \cdot c \cdot \Delta\theta$, wobei m die Masse der Lösung $96 \cdot 0.25 \text{ g}$ in allen 96 Wells ist und c die spezifische Wärmekapazität des Wassers $1 \text{ cal}/(\text{g} \cdot ^\circ\text{C})$. Die Energie W wird in das Produkt $P \cdot \Delta t$ aufgespalten; dabei ist P die für das Verdunsten der Wassermoleküle erforderliche Leistung.

Sie entspricht dem oben berechneten Leistungsanteil von 0.1 W zum Ausgleich des Temperaturverlustes durch Verdunstung. Der gesuchte durchschnittliche Temperaturverlust ergibt sich durch Umformen zu $\Delta\vartheta/\Delta t = P/(m \cdot c) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ °C/s}$; d.h., nach 100 s ist die durchschnittliche Lösungstemperatur bei 37°C und 250 µl Lösungsvolumen in einer Greiner F-MTP im Reader Typ 1400 um ein Zehntel Grad gefallen.

Dieser Zusammenhang besitzt eine große Bedeutung für die Homogenität der Temperatur: falls aus beliebigen Gründen die Verdunstung von Well zu Well verschieden schnell erfolgt, tritt ein unterschiedlich großer Temperaturverlust auf. Wells mit höherer Verdunstungsgeschwindigkeit weisen eine geringere Lösungstemperatur auf. Beispielsweise ist für einen Temperaturunterschied infolge unterschiedlich schneller Verdunstung von 0.2°C nach 3 min bei 250 µl Lösungsvolumen eine im kälteren Well um $1.72 \cdot 10^{-8} \text{ g/(mm}^2 \cdot \text{s)}$ bzw. $2.04 \text{ µl/(Well} \cdot \text{h)}$ höhere Verdunstungsgeschwindigkeit erforderlich. Will man Temperaturinhomogenitäten allein mit verschiedenen Verdunstungsgeschwindigkeiten erklären, müßte letztere sehr stark streuen.

Die Temperatur der Dachheizung muß etwas höher als die gewünschte Lösungstemperatur sein, damit der Wärmeleitung ins Gerät entgegengewirkt wird. Das durch Verdunstung entstehende Kondenswasser stört die Absorbanzmessung, weil es sich an der Oberfläche der Detektoroptik niederschlägt. Auch aus diesem Grund muß eine Dachheizung realisiert werden. Sie soll die Detektoroptik auf einer Temperatur etwas über der Lösungstemperatur halten. Weiterhin sollte die Dachheizung nach oben thermisch isoliert sein, damit zum einen wenig Wärme in den restlichen Geräteinnenraum gelangt und zum anderen mit wenig Heizleistung die erforderliche Dachtemperatur eingestellt werden kann. Praktisch erwies sich eine installierte Leistungsdichte von 0.1 W/cm^2 bei 3 mm Abstand zur Welloberkante und eine Dachtemperatur 3°C über der Lösungssolltemperatur als günstig. Die Dachtemperatur muß geregelt werden, weil störende Einflüsse wie Umgebungstemperatur, Geräteinnentemperatur, Wärmeleitung vom Heizkörper über die Luft und variable Lösungsvolumina existieren.

Die im Heizkörper umzusetzende Heizleistung zum schnellen Aufheizen wird nach der Grundgleichung der Wärmelehre berechnet. Die Summe aller Wärmekapazitäten des Heizkörpers einschließlich der Lösung, der Wells und der thermischen Isolierung beträgt etwa 318 Ws/°C und setzt sich aus den Anteilen nach Tabelle 3.1 zusammen. Mit einer gewünschten Temperaturdifferenz von 15°C und einer gewünschten Aufheizzeit von 60 s ergibt sich die notwendige Heizleistung zu 75 W. Diese kann zwecks Verringerung der Aufheizzeit nicht beliebig erhöht werden, weil die Heizwendeln sehr schmal ausgelegt sein müssen. Die auch während des Aufheizens auftretenden Wärmeverluste infolge Ableitung zur Umgebung und Verdunstung müssen nicht berücksichtigt werden, da durch Variation der umgesetzten Heizleistung und der Aufheizzeit der Energieumsatz im Heizkörper in weiten Grenzen ge-

steuert werden kann. Insofern dient die Berechnung der umzusetzenden Heizleistung lediglich der Auslegung der Geometrie der Heizleiter.

	Werkstoff	Masse m	spez. Wärmekapazität c	m·c
Heizkörper	Aluminium	140 g	$0.895 \text{ Ws/(g} \cdot ^\circ\text{C)}^{1)}$	$125 \text{ Ws/}^\circ\text{C}$
Wärmeisolierung	PUR-Hartschaum	30 g	$1.51 \text{ Ws/(g} \cdot ^\circ\text{C)}^{2)}$	$45.3 \text{ Ws/}^\circ\text{C}$
Nunc-strips	PS	36.4 g	$1.3 \text{ Ws/(g} \cdot ^\circ\text{C)}^{2)}$	$47.3 \text{ Ws/}^\circ\text{C}$
Lösung 96·250µl	Wasser	24 g	$4.18 \text{ Ws/(g} \cdot ^\circ\text{C)}^{3)}$	$100 \text{ Ws/}^\circ\text{C}$
thermischer Widerstand eines Wellmantels: 19.2°C/W				
thermische Zeitkonstante Wellmantel-Lösung: $(19.2^\circ\text{C/W}) \cdot (100 \text{ Ws/}^\circ\text{C}) / 96 = 20 \text{ s}$				

Tabelle 3.1: Werkstoffe des Heizkörpers, Lösung, deren Massen, spezifische Wärmekapazitäten und Wärmekapazitäten m·c. Der thermische Widerstand eines Wellmantels berechnet sich mit der Dicke 0.5mm, der benetzten Oberfläche 153 mm² bei 250 µl und der Wärmeleitzahl von PS 0.17 W/(K·m) [o.V. Hüttig 1997]. PS=Polystyrol, PUR=Polyurethan; ¹⁾[Philippow 1976 Band 1 S.827], ²⁾[o.V. Hüttig 1997], ³⁾[Altmann 1984 S.167]

Aus den gleichen Gründen wie bei der Dachheizung muß auch die Heizkörpertemperatur geregelt werden, nur etwas präziser als die Dachtemperatur. Die Regelung der Heizkörpertemperatur erfordert eine im Vergleich zum Aufheizen niedrige Leistung. Es müssen nur die Wärmeverluste durch Ableitung ins Geräteinnere und durch Verdunstung ausgeglichen werden. Eine Regelung der Lösungstemperatur entfällt aufgrund der in der Einleitung beschriebenen Randbedingungen.

3.1.2. fluoreszenzmessender Reader

3.1.2.1. Auswahl der MTP, Entwurf von Heizkörper und Dachheizung

Um die Anwendung der eben beschriebenen Lösung nicht auf einen absorbanzmessenden Reader beschränken zu müssen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, auch den fluoreszenzmessenden Reader Fluoroskan II derartig zu verändern.

Es wird kein durchgehender Lichtweg gebraucht, da von oben gemessen wird. Dadurch muß der Verlauf der Heizleiter im Heizkörper nicht den Wellpositionen angepaßt werden. Der so mögliche durchgehende metallische Boden trägt zur Homogenisierung durch Wärmeleitung bei.

Um den für geringe thermische Widerstände nötigen Formschluß zwischen Heizkörper und MTP zu gewährleisten, ist es nötig, sich auf einen bestimmten Wellquerschnitt festzulegen. Deshalb wurde zunächst nach einer brauchbaren MTP gesucht. Es muß eine MTP mit 96 Wells, mindestens 100 µl/Well wegen praktikabler Hantierung der Lösungen, möglichst dünnen Wellwänden wegen guter Wärmeleitung und frei hängenden Wells wegen gewünschter einfacher Herstellung des Heizkörpers sein. Bei frei hängenden Wells ist es möglich, zur Herstellung der 96 runden Öffnungen im Heizkörper einen entsprechend geformten Fräser zu verwenden. Läßt man Stege zwischen den Wells zu, müssen eckige die

Wellmäntel umschließende Formen hergestellt werden. Läßt man weiterhin durchgehende Bodenflächen in der MTP zu, ist die Wellmantelfläche der Wärmeleitung nicht mehr zugänglich. Der Blindwert und der VK einer befüllten MTP sollen möglichst klein sein. An die optische Transparenz des MTP-Werkstoffes werden keine Forderungen gestellt. Auch eine starke optische Dämpfung der Wellmantelflächen zur Verhinderung des Übersprechens vom Nachbarwell muß nicht gefordert werden, da diese Funktion vom Heizkörper übernommen wird.

Es erweist sich, daß die für die PCR hergestellten MTP der Fa. Corning Costar die gestellten Forderungen erfüllen (Tabelle 3.2).

Firma	Typ	Volumen	VK
Greiner	Flachboden PS	150 µl	9 %
Greiner	Flachboden PS	130 µl	9 %
Corning Costar	Thermowell 6510	150 µl	2 %
Corning Costar	Thermowell 6510	130 µl	1.9 %
Corning Costar	Thermowell 6512	150 µl	16 %

Tabelle 3.2: zur Wahl stehende MTP für Heizkörper im Fluoroskan II. Die Greiner F-MTP wurden zum Vergleich aufgeführt. Zur Ermittlung des VK der Fluoreszenzmeßwerte über die MTP wurden alle Wells mit einer Lösung 100 ml 0.1 M TRIS (pH=7.7 bei 22°C) + 125 µl 10 mM 4-MU befüllt.

Gewählt wurde wegen des niedrigen VK die Corning Costar-MTP Thermowell 6510. Für diesen MTP-Typ wurde ein Heizkörper gebaut. Die für die Erwärmung wichtigen Materialeigenschaften des Heizkörpers mit MTP und Lösung sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

	Werkstoff	Masse m	spez. Wärmekapazität c	m·c
Heizkörper	Aluminium	283 g	$0.895 \text{ Ws/(g} \cdot ^\circ\text{C)}^{1)}$	$253 \text{ Ws/}^\circ\text{C}$
MTP	Polykarbonat	8 g	$1.17 \text{ Ws/(g} \cdot ^\circ\text{C)}^{2)}$	$9.36 \text{ Ws/}^\circ\text{C}$
Lösung 96·130µl	Wasser	12.48 g	$4.18 \text{ Ws/(g} \cdot ^\circ\text{C)}^{3)}$	$52.2 \text{ Ws/}^\circ\text{C}$
thermischer Widerstand eines Wellmantels: 9.8°C/W				
thermische Zeitkonstante Wellmantel-Lösung: $(9.8^\circ\text{C/W}) \cdot (52.2 \text{ Ws/}^\circ\text{C}) / 96 = 5.3 \text{ s}$				

Tabelle 3.3: Werkstoffe des Heizkörpers und enthaltene Lösung, deren Massen, spezifische Wärmekapazitäten und Wärmekapazitäten m·c; MTP: Corning Costar Thermowell 6510. Der thermische Widerstand eines Wellmantels berechnet sich mit der Dicke 0.25mm, der benetzten Oberfläche 122 mm² bei 130 µl und der Wärmeleitzahl von Polykarbonat 0.21 W/(K·m) [o.V. Hüttig 1997]; ¹⁾[Philippow 1976 Band 1 S.827], ²⁾[o.V. Hüttig 1997], ³⁾[Altmann 1984 S.167]

Die Beheizung erfolgt mit einer im Boden des Heizkörpers untergebrachten Heizfolie der Firma minco.

Der Heizkörper wurde in der Form der o.g. MTP gebaut, so daß die MTP auf den Heizkörper von oben aufgedrückt werden kann. Der Heizkörper paßt konstruktiv in den fluoreszenzmessenden Reader hinein. Die Homogenisierung der Temperaturverteilung wird durch die vollständige Ausführung des Heizkörpers aus Aluminium erreicht.

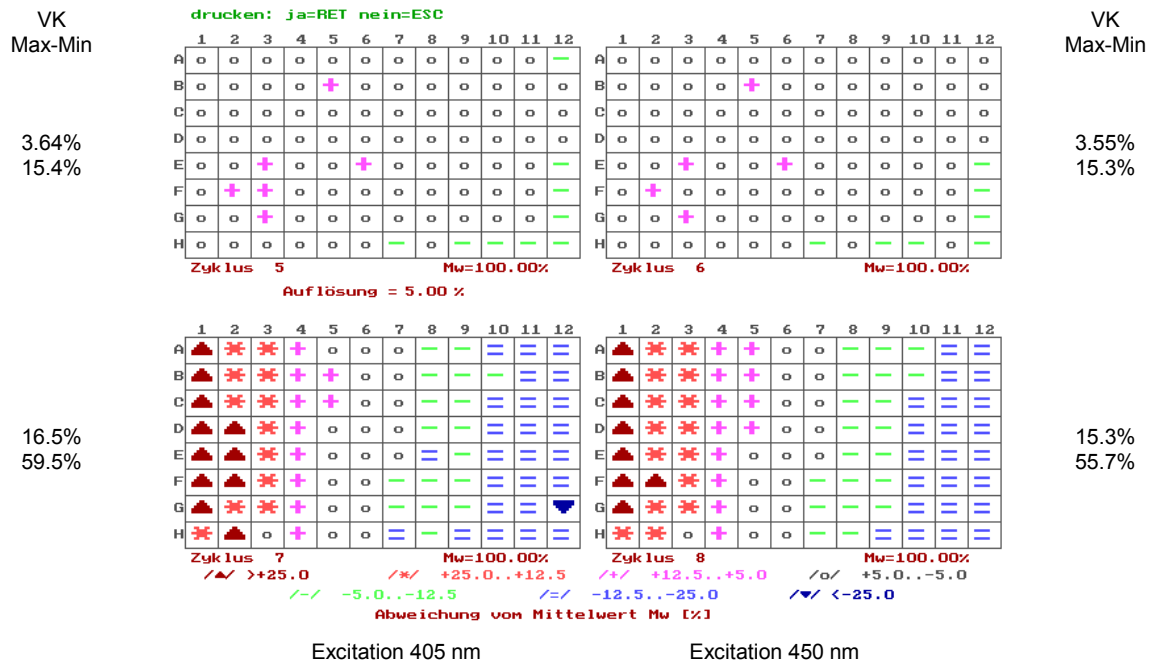


Abb. 3.2: Darstellung der auf einen Zyklusmittelwert Mw von 100 % normierten Fluoreszenz-Meßwerte (keine Temperaturen!) vom Fluoroskan II bei auf 40°C befindlichem Heizkörper (Zyklen 7 und 8) im Vergleich zu nicht beheiztem Heizkörper (Zyklen 5 und 6), ohne Dachheizung, Emission jeweils 538 nm, 130µl 2µM HPTS in Phosphatpuffer pH=7.5, Corning Costar-MTP Thermowell 6510. Als Puffer wurde Phosphatpuffer eingesetzt, weil sein pH-Wert nicht temperaturabhängig ist.

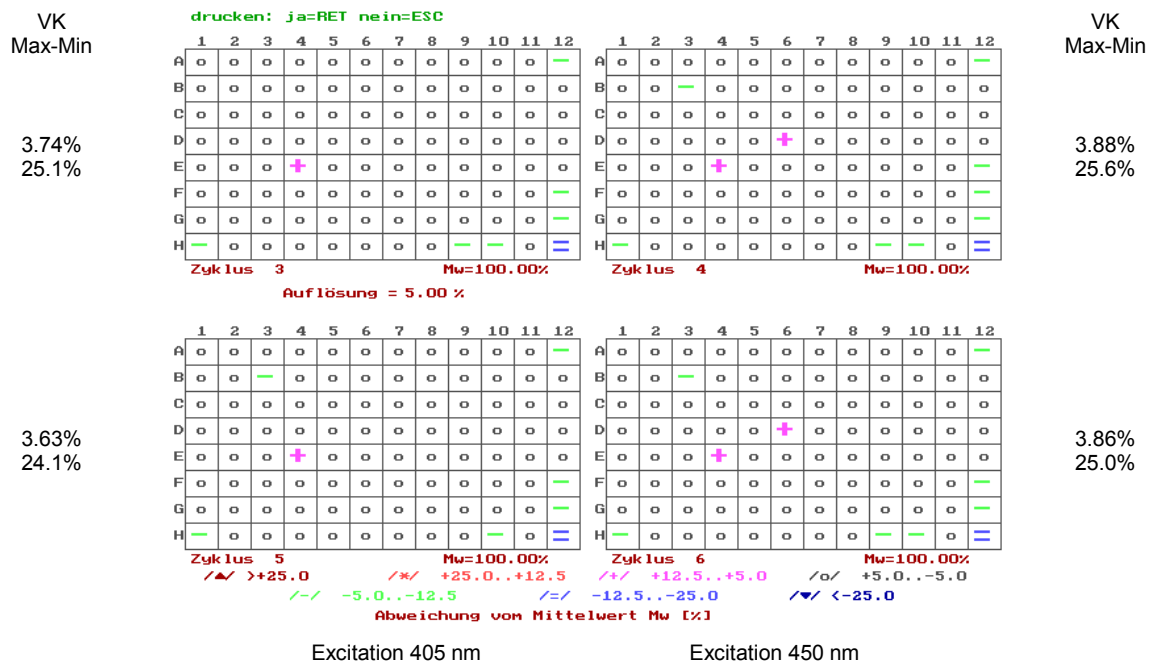


Abb. 3.3: Darstellung der auf einen Zyklusmittelwert Mw von 100 % normierten Fluoreszenz-Meßwerte (keine Temperaturen!) vom Fluoroskan II bei auf 40°C befindlichem Heizkörper (Zyklen 6 und 7) im Vergleich zu nicht beheiztem Heizkörper (Zyklen 3 und 4), mit Dachheizung, Emission jeweils 538 nm, 130µl 2µM HPTS in Phosphatpuffer pH=7.5, Corning Costar-MTP Thermowell 6510. Als Puffer wurde Phosphatpuffer eingesetzt, weil sein pH-Wert nicht temperaturabhängig ist.

Bei der Testung dieses Heizkörpers im Fluoroskan II wurde bei Erwärmung von Heizkörper und Lösung eine starke Gradientenbildung über die MTP festgestellt. Die in Abb. 3.2 dargestellten Fluoreszenzmeßwerte fallen im erwärmten Zustand von Spalte 1 zu Spalte 12 um bis zu 30 % ab. Der VK beträgt etwa 15 % (Abb. 3.2, Zyklus 7 und 8), vgl. mit unbeheiztem

Zustand (Abb. 3.2, Zyklus 5 und 6). Die Untersuchung dieser sehr inhomogenen Verteilung der Meßwerte ergab als Ursache das Beschlagen der Detektoroptik während der Messung im Fluoroskan II. Die gemessene schlechte Homogenität kann ihre Ursache nicht in verschiedenen Welltemperaturen haben, denn der pH-Wert des eingesetzten Phosphatpuffers und damit die Fluoreszenzmeßwerte sind temperaturunabhängig.

Der Meßvorgang fängt in Spalte 1 an und hört in Spalte 12 auf. Innerhalb der dafür benötigten Zeit von 63 s beschlägt die Optik immer mehr. Die zuletzt gemessenen Spalten sind am stärksten betroffen.

Aus den bereits beim absorbanzmessenden Reader genannten Gründen Verhinderung der Wärmeableitung aus den Randwells, Einschränkung der Verdunstung und Vermeiden des Beschlagens der Optik wurde in den fluoreszenzmessenden Reader ebenfalls eine Dachheizung eingebaut.

Ist die Dachheizung etwa 3°C wärmer als die Lösung, beschlägt die Optik des Detektors nicht mehr. Dadurch ist die Homogenität über die MTP deutlich besser geworden, der o.g. starke Gradient ist deutlich schwächer. Es wurde auf 40°C aufgeheizt und zweimal mit je zwei Wellenlängen gemessen. Die VK erreichen Werte von 3.6...3.9 % (Abb. 3.3).

Die Verwendung der Corning Costar-MTP Thermowell 6510 aus dem Werkstoff Polycarbonat im beschriebenen Aluminium-Heizkörper bewirkt eine Erhöhung der Blindwerte und der Meßwerte des fluoreszenzmessenden Readers Fluoroskan II gegenüber den für untemperierte Messungen sonst verwendeten schwarzen Greiner F-MTP. Die Faktoren der Erhöhung der Blindwerte sind größer als die Faktoren der Erhöhung der Meßwerte, d.h., der Abstand zum Hintergrundsignal sinkt. Tabelle 3.4 zeigt die Blindwerte und die Meßwerte beider MTP.

	Blindwerte		Meßwerte	
	405 nm	450 nm	405 nm	450 nm
Corning Costar Thermowell 6510	160	15	2580	721
schwarze Greiner F-MTP	0.75	0.12	184	53

Tabelle 3.4: Blindwerte und Meßwerte einer MTP Corning Costar Thermowell 6510 im Heizkörper und einer schwarzen Greiner F-MTP bei Excitation mit 405 nm und 450 nm, Emission jeweils 538 nm; Meßwerte jeweils mit 130 µl 2µM HPTS in Phosphatpuffer pH=7.5.

Das Heizverfahren funktioniert unabhängig von einer auf die MTP aufgeklebten Folie. Das Messen während des Aufheizens ist prinzipiell möglich. Der Heizkörper erfordert Steckverbinder und Kabel für die Heizung und den Temperatursensor. Das zusätzliche Bauvolumen für das Heizungssystem ist nicht zu vernachlässigen, weil Stromversorgungen für Heizkörper und Dachheizung nötig sind. Der Einsatz moderner Schaltnetzteile gestattet eine deutliche Volumenverringerung gegenüber den bis jetzt verwendeten Laborstromversorgungen. Die geforderte Vielfalt einsetzbarer MTP konnte nicht erfüllt werden, da das schnelle Aufheizen

der Lösung auf einen Formschluß zwischen MTP und Heizkörper angewiesen ist. Einsetzbar sind nur MTP vom Typ Thermowell 6510 oder solche mit gleichem Wellquerschnitt.

Der Heizkörper besitzt nach Tabelle 3.3 die etwa fünffache Wärmekapazität der Lösung. Entsprechend wird gegenüber der Lösung auch die fünffache Energie zur Temperierung benötigt. Da die investierte Gesamtenergie von $200 \text{ W} \cdot 25 \text{ s}$ nicht übermäßig groß ist, spielt das Verhältnis keine wichtige Rolle. Zur Herstellung des Heizkörpers wurden ausschließlich gewöhnliche Bearbeitungsverfahren wie Bohren, Sägen, Fräsen, Kleben und Weichlöten angewendet. Für den Einsatz des Heizkörpers sind keine einzelnen extrem teuren Komponenten nötig. Daher ist zu erwarten, daß der angestrebte Preis von 3...4 TDM gehalten werden kann.

Nachteilig für die Empfindlichkeit gegenüber der Lösungskonzentration wirkt die deutliche Erhöhung der Blindwerte der MTP Thermowell 6510 gegenüber den ohne Temperierung vorrangig verwendeten schwarzen Greiner F-MTP. Nach Tabelle 3.4 ist der Blindwert bei 405 nm rund 200 mal und bei 450 nm rund 120 mal höher. Genauere Angaben sind nicht sinnvoll, da die Blindwerte selbst bei ganz neu aus der Verpackung genommenen MTP um einen Faktor von 2...5 von MTP zu MTP schwanken können. Abschwächend wirkt, daß aufgrund der verschiedenen Wellquerschnitte der beiden betrachteten MTP bei gleichem Lösungsvolumen die Meßwerte der MTP Thermowell 6510 bei 405 nm und 450 nm je etwa 14 mal größer sind als die der schwarzen Greiner F-MTP (Tabelle 3.4). Das bedeutet, daß die Empfindlichkeit des Meßsystems MTP-Lösung-Fluoroskan II nur mit dem Verhältnis bei der Erhöhungen abgenommen hat: bei 405 nm etwa $200/14 \approx 14$ fach und bei 450 nm etwa $120/14 \approx 9$ fach. Für gleiche Meßwertabstände zum Hintergrund ist folglich wegen der stärker betroffenen Wellenlänge 450 nm eine 14 mal höhere Lösungs-Konzentrationen vorzusehen. Ein Versuch ergibt, daß die MTP Thermowell 6510 den fünffachen Blindwert des Heizkörpers ohne MTP verursacht, d.h., die Blindwerterhöhung ist in erster Linie auf die MTP zurückzuführen. Die Erhöhung der Meßwerte dagegen ist auf die Wellgeometrie zurückzuführen: kleineres Wellvolumen und kegelförmiger Querschnitt führen bei gleichem Lösungsvolumen und gleicher Konzentration zu höheren Meßwerten bei der MTP Thermowell 6510 infolge geringeren Abstand der Lösungsoberfläche zum Detektor.

Eine Beseitigung der großen Blindwerte ist voraussichtlich durch die Verwendung von schwarzem PS wie bei der Greiner F-MTP in der Form der Thermowell 6510 möglich.

3.1.2.2. Homogenität und Aufheizzeit

Mit Hilfe des entworfenen Heizkörpers, der eingebauten Dachheizung und der Kalibrierkurve ist es nun möglich, die Homogenität und den VK der Welltemperaturen in der beheizten MTP im Fluoroskan II zu messen. Dazu wurden alle Wells der MTP mit der Lösung des optischen Thermometers gefüllt. Die Dachheizung wurde bereits vorher auf 40°C eingestellt, um den

Meßraum vorzuheizen. Zu Beginn wurde die Temperaturverteilung im ungeheizten Zustand des Heizkörpers nach Homogenisierung durch ihn ermittelt (Abb. 3.4 Zyklus 1). Es ist eine sehr gleichmäßige Temperaturverteilung sichtbar. Die folgenden Zyklen 2 bis 4 zeigen die Temperaturverteilung in dem auf 37°C aufgeheizten Heizkörper. Danach wurde dreimal direkt hintereinander die Temperaturverteilung ermittelt. Infolge der für jede einzelne Messung benötigten Zeit vollzog sich eine Homogenisierung. Im Zyklus 4 sind geringfügig kältere Randwells erkennbar. Das ist auf die mangelhafte thermische Isolierung des Heizkörpers zum Geräteinneren zurückzuführen. Die Homogenität liegt im geheizten Zustand zwischen 0.12 und 0.16°C bzw. der VK zwischen 0.32 und 0.43 %.

Aus Platzgründen war das Anbringen einer wärmedämmenden Isolierung wie beim absorbanzmessenden Reader nicht möglich.

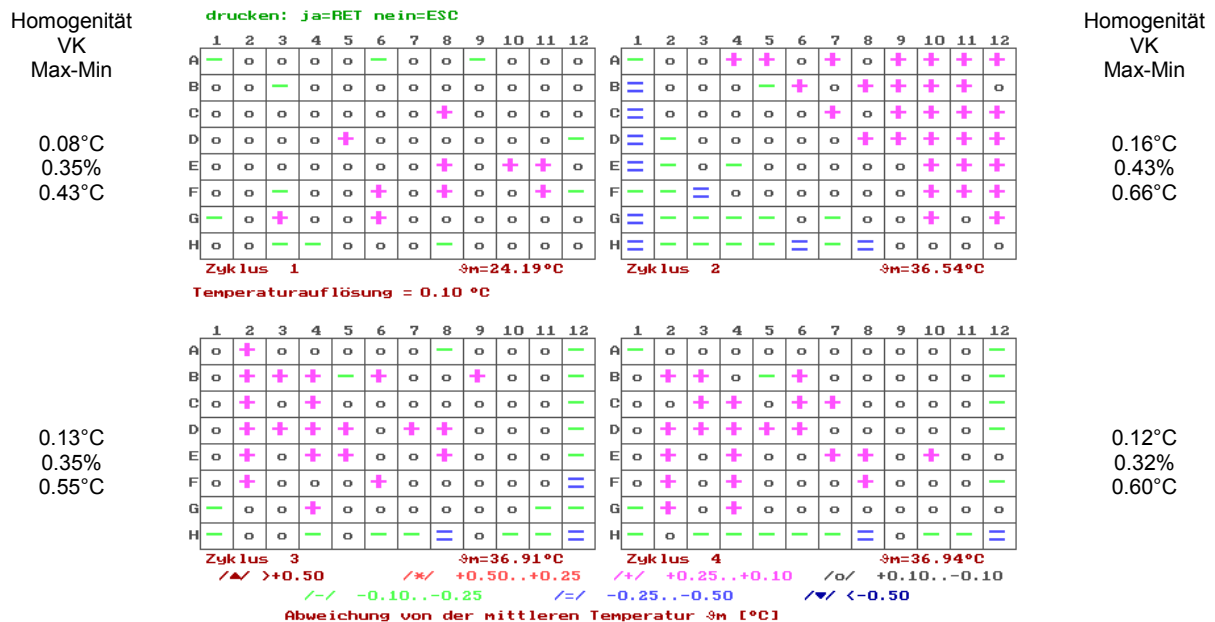


Abb. 3.4: Temperaturverteilung vor und nach Aufheizen des Heizkörpers auf 37°C, Dachheizung 40°C, Lösung: 130µl 2µM HPTS in 0.1M TRIS (pH=7.52 bei 22°C), Corning Costar-MTP Thermowell 6510

Als nächstes wurde untersucht, wie groß die Aufheizzeit der Lösung in der MTP ist. Dazu wurde eine Corning Costar-MTP Thermowell 6510 mit 130 µl Aqua dest je Well befüllt, auf den Heizkörper aufgesetzt und bei einer Raumtemperatur von 25°C in den Meßraum des Fluoroskan II gestellt. Der Temperatursensor des elektronischen Thermometers DTMS 5...60°C befand sich im Well E7. Die Temperatur der Dachheizung wurde schon vor Beginn der Messung auf 40°C eingestellt. Sofort mit dem Einsetzen der MTP und dem Schließen des Meßraumdeckels wird die Heizleistung von 200 W an den Heizkörper gelegt. Nach einer Heizzeit von 25 s wird die Heizleistung abgeschaltet und auf eine Zwei-Punkt-Regelung mittels des ISM 01 umgeschaltet. Diese dient zum Halten der Lösungstemperatur. Nach dem Abschalten der Heizleistung ist gerade soviel Wärmeenergie im Heizkörper, daß die Lösungstemperatur, die in diesem Moment noch niedriger als ihr Sollwert ist, nicht über-

schwingt. Die Zeit, nach der die Lösungstemperatur 38°C erreicht hat, beträgt 100 s (Abb. 3.5). Zum Erreichen einer anderen gewünschten Temperatur muß die Heizzeit verändert werden. Untersuchungen dazu werden im Kapitel 4 „Das optimale Heizregime“ dargestellt.

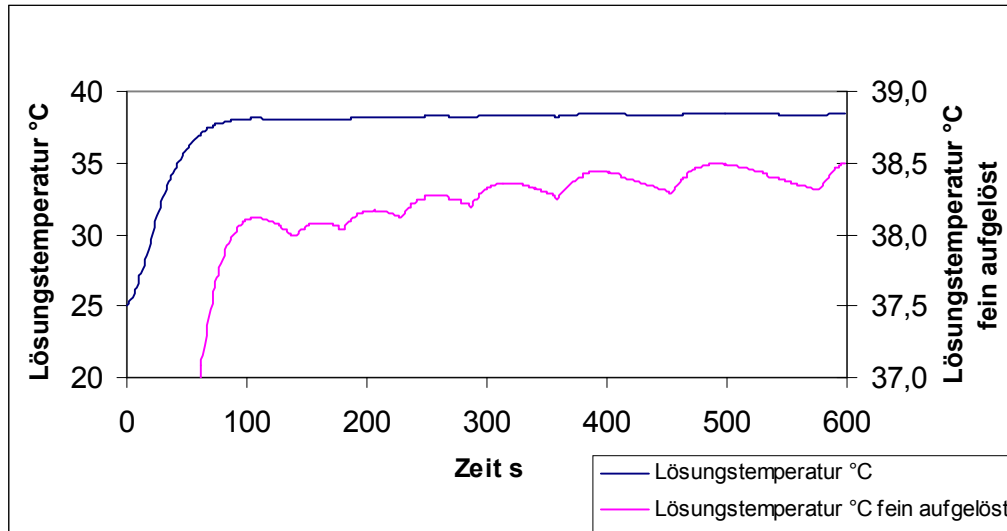


Abb. 3.5: Im Well E7 mit dem elektronischen Thermometer DTMS 5... 60°C gemessene Lösungstemperatur beim Aufheizen des Heizkörpers, Corning Costar-MTP Thermowell 6510, 130 μl Aqua dest je Well, 200 W Heizleistung, Dachheizung auf 40°C

Aus der fein aufgelösten Darstellung ist nach Ablauf der Heizzeit eine fortdauernde Änderung der Lösungstemperatur ersichtlich. Ein periodisches Verhalten und ein langsamer Anstieg überlagern sich. Das periodische Verhalten liegt am eingesetzten Zweipunkt-Regler. Dieser schaltet immer dann eine konstante Heizleistung zu, wenn die Sensortemperatur im Heizkörper unter den Sollwert von 37°C sinkt. Nach wenigen Sekunden wird der Sollwert überschritten, der Regler schaltet die Heizleistung ab. Aufgrund der verteilten Wärmekapazitäten im System Heizkörper-MTP-Lösung steigt die Lösungstemperatur weiter, bis der Nachschub aus dem Heizkörper nachläßt. Die Lösungstemperatur sinkt infolge Wärmeleitung zur Umgebung und Verdunstung. Die Vergrößerung der Periodendauer ist auf das langsame Ansteigen der mittleren Lösungstemperatur zurückzuführen. Je wärmer die Lösung wird, um so länger braucht der Heizkörper für die Abkühlung auf 37°C . Eine Größenverringerung der periodischen Temperaturschwankungen ist durch eine geringere Heizleistung nach dem Ende der Heizzeit erreichbar. Die prinzipielle Beseitigung gelingt nur mit Hilfe eines nicht schaltenden Reglers. Es kann ein an sich bekannter PI-Regler eingesetzt werden.

Die Ursache für das langsame Ansteigen der mittleren Lösungstemperatur liegt an der zusätzlichen Erwärmung der Lösung durch die Dachheizung. Die Dachtemperatur ist für den Regelkreis Heizkörpertemperatur als Störgröße anzusehen. Sie wirkt auf die Lösungstemperatur, weil nicht letztere, sondern die Heizkörpertemperatur geregelt wird. Zwischen dem Temperatursensor im Heizkörper und der Lösung befinden sich thermische Widerstände und

Wärmekapazitäten, die zusammen mit denen zwischen Lösung und Dachheizung ein thermisches System darstellen, in dessen Innerem sich die Lösung befindet. Wie Abb. 3.5 zeigt, ist das thermische System Dachheizung-Luftvolumen-Lösung-MTP-Heizkörper nach 10 min noch nicht im Gleichgewicht. Die schnellere Herstellung des Gleichgewichtszustandes ist auf zwei Wegen möglich: a) Man verringert den Einfluß der Dachheizung auf die Lösungstemperatur durch Herabsetzen der Dachtemperatur oder Vergrößern des Abstandes zur MTP, theoretisch auch durch Einsatz eines Gases zwischen Dachheizung und Lösung mit einer gegenüber Luft geringeren Wärmeleitzahl; b) Man verbessert die thermische Ankopplung der Lösung an den Heizkörper durch einen kürzeren Weg zwischen Heizfolie und Lösung oder durch Anwendung dünnerer Wellwände. Der Einsatz von Wärmeleitpasten zwischen Well und Heizkörper zum Ausgleich unpräziser Wellformen hat experimentell keine Verbesserung der thermischen Ankopplung gezeigt, d.h., der Formschluß zwischen Well und Heizkörper ist hinreichend gut.

3.1.3. vergleichende Betrachtung zum Energieeintrag

Bei beiden Readern erfolgt die Erwärmung der Lösung mittels Wärmeleitung vom Heizkörper durch den Wellmantel hindurch in die Lösung hinein. Dabei muß die Heizleistung den thermischen Widerstand des Wellmantels überwinden, der zusammen mit der Wärmekapazität der Lösung eine thermische Zeitkonstante bildet; zu den Zahlenwerten siehe Tabellen 3.1 und 3.3. Das System Wellmantel-Lösung stellt näherungsweise einen Tiefpaß 1. Ordnung dar, wobei beim Fluoroskan II die thermische Ankopplung der Lösung an den Heizkörper wegen der geringeren Zeitkonstanten besser ist. Unter Beachtung der verschiedenen zur Verfügung stehenden Heizleistungen, der Werkstoffeigenschaften und der geometrischen Gegebenheiten läßt sich für den Reader Typ 1400 eine lösungsvolumenbezogene Leistung von $1.14 \text{ mW}/\mu\text{l}$ und für den Fluoroskan II von $2.78 \text{ mW}/\mu\text{l}$ berechnen. Hieraus ergeben sich theoretische Aufheizgeschwindigkeiten von 0.27°C/s bzw. 0.66°C/s . Die gemessenen Aufheizgeschwindigkeiten zeigt Tabelle 2.5. Infolge der schlechteren thermischen Ankopplung ist die gemessene Aufheizgeschwindigkeit beim Reader Typ 1400 deutlich kleiner als die berechnete (65%). Beim Fluoroskan II stimmen sie wesentlich besser überein (91%).

Durch höhere Heizleistung und bessere thermische Ankopplung der Lösungstemperatur an die Heizkörpertemperatur beim Fluoroskan II kommt die Einschwingzeit der Lösungstemperatur in den geforderten Bereich von 1...2 min. Allgemein kann die Verringerung der Einschwingzeit der Lösungstemperatur durch eine höhere Heizleistung und eine kleinere thermische Zeitkonstante erreicht werden. Letzteres führt auf dünnere Wellwände, eine höhere Wärmeleitzahl des MTP-Werkstoffes und unter Berücksichtigung des Zusammenhangs zwischen benetzter Wellmantelfläche und Lösungsvolumen auf einen möglichst kleinen Wellradius.

3.2. Erwärmung durch Infrarot-Strahlung

3.2.1. Erwärmung durch Temperaturstrahler niedriger Temperatur (Dunkelstrahler)

Im Anhang D wird begründet, warum eine gegenüber der Umgebungstemperatur hohe Oberflächentemperatur eines Körpers für die Erwärmung der Lösung genutzt werden kann. Das Vorhandensein dieser hohen Oberflächentemperatur und das schnelle zur Verfügung Stehen der Strahlungsleistung bei Glaskeramikkochfeldern führte auf den Gedanken, die Aufgabenstellung mit einem solchen Kochfeld zu lösen.

Glaskeramikkochfelder brauchen aufgrund ihrer freiliegenden Heizwendeln nur etwa 10 s, um ihre Endtemperatur zu erreichen. Die Wärmekapazität ist niedrig. Es ist außer der Heizwendel nur wenig Masse zu erwärmen.

Die folgenden Untersuchungen wurden am absorbanzmessenden Reader Typ 1400 durchgeführt. Zunächst wurde ein Kochfeld Ø 18 cm der Firma EGO (Dunkelstrahler I) verwendet. 250 µl TRIS-Kresolrot-Lösung wurden in Nunc-strips im Kunststoffrahmen gefüllt und zur Feststellung des Ausgangszustandes vermessen (Abb. 3.6 Zyklus 1), danach 28 mm mittig über dem mit 460 W gespeisten Strahler positioniert und parallel zu den MTP-Spalten hin- und herbewegt. Die Bewegung dient dem Ausgleich von lokalen Inhomogenitäten der Leistungsdichte in einer Richtung. Ohne Bewegung entstehen unter sonst gleichen Bedingungen Homogenitäten um 2°C (Bild nicht dargestellt). Nach einer Aufheizzeit von 16 s wurde die entstandene Temperaturverteilung erneut gemessen (Abb. 3.6 Zyklen 2 bis 4). Die Aufheizgeschwindigkeit $\Delta\vartheta/\Delta t$ ergibt sich zu 0.70°C/s und ist genügend groß.

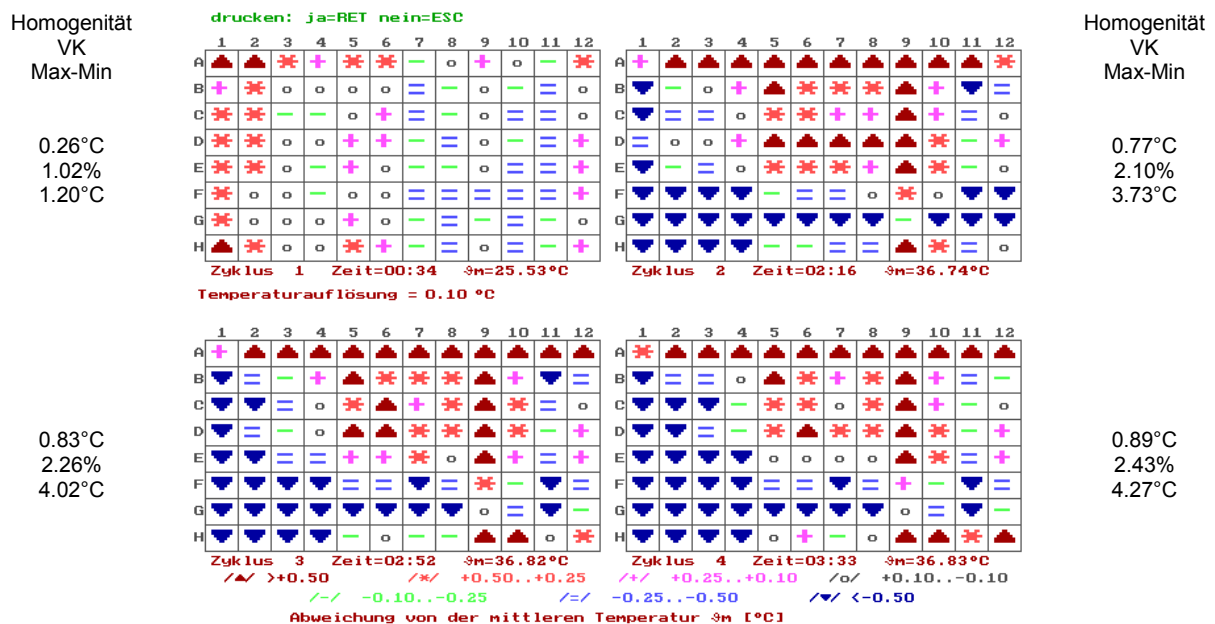


Abb. 3.6: Aufheizung von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.93 bei 21.2°C in Nunc-strips im Kunststoffrahmen 28 mm über dem Dunkelstrahler I, Leistung 460 W, manuell in Spaltenrichtung hin- und herbewegt, ohne homogenisierenden Aluminiumblock, Reader auf 40°C vorgeheizt

Die mit dieser Methode erreichte Homogenität im geheizten Zustand ist mit 0.8...0.9°C immer noch deutlich zu schlecht. Die Homogenität wird mit einem Bereich angegeben, um die Abhängigkeit von der Zeit deutlich zu machen. Um eine Verbesserung zu schaffen, wurden die Nunc-strips nicht in ihren Kunststoffrahmen, sondern in einen passend zu den Nunc-strips hergestellten Aluminiumblock gepreßt. Dieser dient außer zur Halterung der Nunc-strips besonders der Wärmeleitung zwischen den Wells. Zunächst wurde wieder der Ausgangszustand vermessen (Abb. 3.7 Zyklus 1), dann wie oben über dem Strahler positioniert, bewegt und nach 75 s Anheizzeit vermessen (Abb. 3.7 Zyklen 2 bis 4).

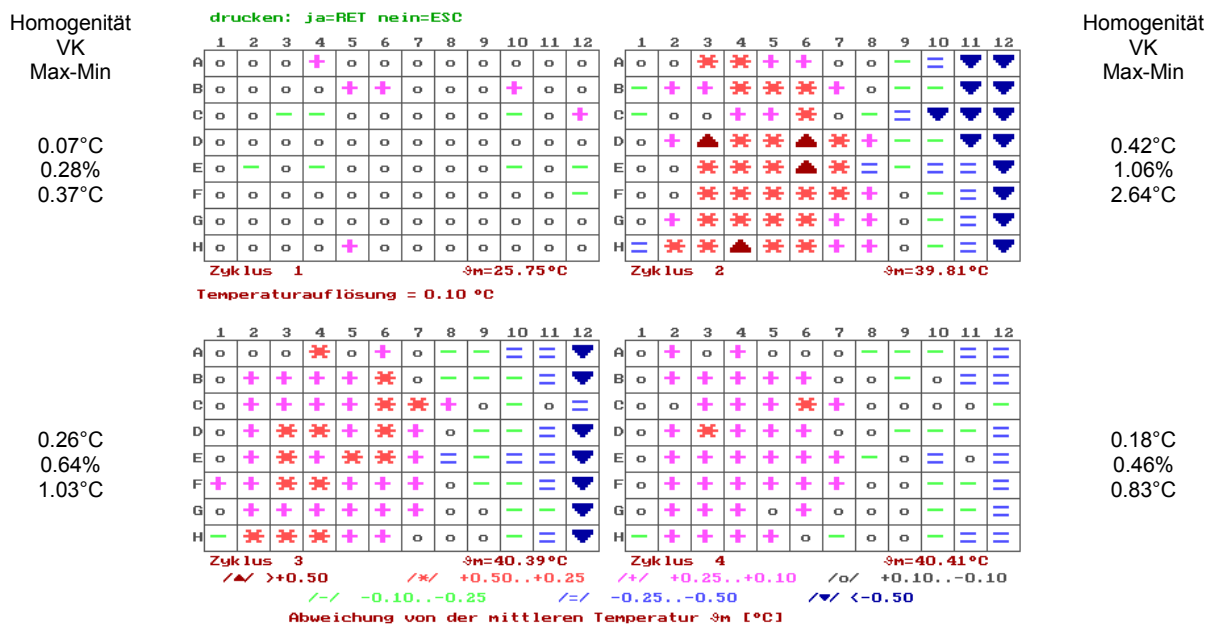


Abb. 3.7: Aufheizung von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.93 bei 21.2°C in Nunc-strips 28 mm über dem Dunkelstrahler I, Leistung 460 W, manuell in Spaltenrichtung hin- und herbewegt, mit homogenisierendem Aluminiumblock, Reader auf 40°C vorgeheizt

Die so erreichte Homogenität der Temperatur ist mit 0.4...0.2°C schon deutlich besser. Sie verbessert sich wegen der Wärmeleitung im Aluminiumblock weiter und beträgt 4 min nach Zyklus 2 0.12°C (Bild nicht dargestellt). Die Aufheizgeschwindigkeit $\Delta\theta/\Delta t$ ergibt sich zu 0.19°C/s und ist noch genügend groß.

Die eingesetzte Heizleistung hat einen deutlichen Einfluß auf die Aufheizzeit. Im folgenden Versuch wurden Kunststoffrahmen mit Nunc-strips bestückt, mit 250 µl TRIS-Kresolrot-Lösung befüllt und ohne Aluminium-Block jeweils 28 mm über dem Strahler positioniert. Die Nunc-strips wurden so positioniert, daß sich das Referenzwell in der Mitte des Kunststoffrahmens über der unteren Hälfte des Strahlers befand, damit es nicht weniger Leistung bekommt als andere Wells. Abb. 3.8 zeigt die gemessenen Aufheizzeiten in Abhängigkeit von der eingesetzten Heizleistung. Weiterhin wurde der Einfluß des Abstandes auf die Aufheizzeit ermittelt. Dazu wurden wieder mehrere Kunststoffrahmen mit Nunc-strips bestückt, mit 250 µl TRIS-Kresolrot-Lösung befüllt und die Heizleistung auf 460 W eingestellt. Die

Nunc-strips wurden genau wie bei der Messung der Abhängigkeit von der Leistung (Abb. 3.8) positioniert. Abb. 3.9 zeigt die gemessenen Aufheizzeiten in Abhängigkeit vom Abstand.

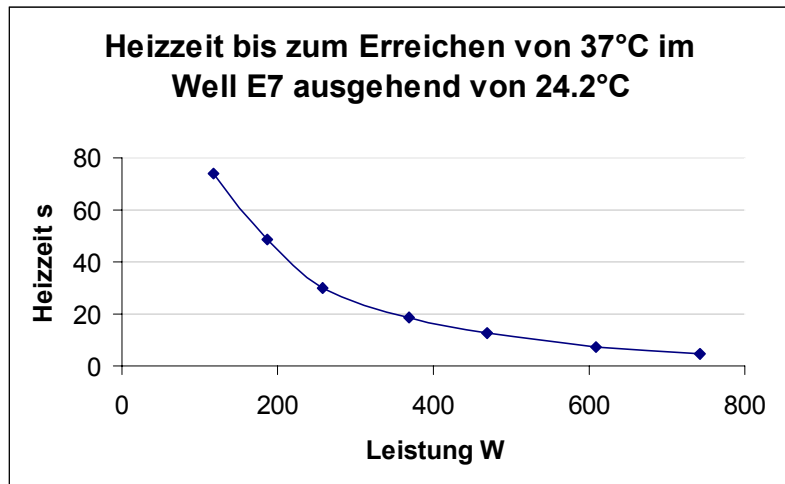


Abb. 3.8: Einfluß der Heizleistung auf die Heizzeit, Nunc-strips im Kunststoffrahmen 28 mm über dem Dunkelstrahler I, Leistung 460 W, Lösung 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.89 bei 20.9°C. Die dargestellte Heizzeit ist die reine Einschaltzeit des Dunkelstrahlers. In allen Abbildungen einer Temperaturverteilung beginnt die Zeitmessung mit einer Ausgangsmessung im Reader, wobei Schüttelzeiten und manuelle Bedienhandlungen hinzukommen.

Versuche ohne Bewegung der MTP bzw. der Nunc-strips relativ zum Strahler sowohl ohne einen als auch mit einem homogenisierenden Aluminiumblock ergaben eine Abbildung der Lage der Heizwendeln auf die entstehende Temperaturverteilung. Die Heizwendeln dieses Strahlers sind in Form konzentrischer Kreissegmente angeordnet. Die verbleibende Fläche nimmt ein von einem Punkt des Umfangs zur Mitte hin eingebauter Bimetallschalter zum Schutz gegen Übertemperatur des Strahlers ein. Diese Tatsachen führten auf den Gedanken, seine Form zu modifizieren.

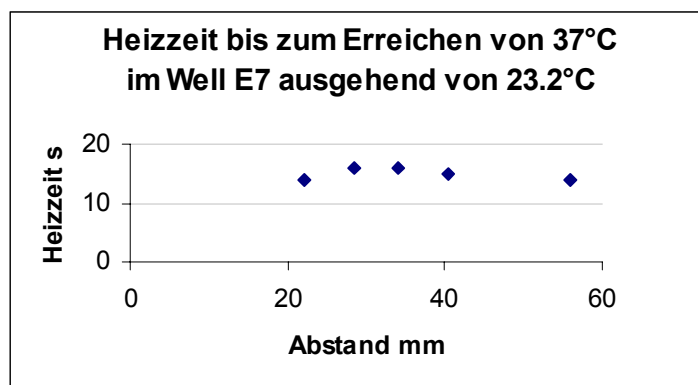


Abb. 3.9: Einfluß des Abstandes auf die Heizzeit, Nunc-strips im Kunststoffrahmen 28 mm über dem Dunkelstrahler I, Leistung 460 W, Lösung 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.89 bei 20.9°C. Zur Angabe der Heizzeit siehe Legende zu Abb. 3.8.

Es wurden die Heizwendeln aus einem runden Glaskeramikkochfeld herausgelöst und in einem Rechteck der Größe 145·95 mm² wieder fixiert. Damit wurde ein Überhang über die

MTP-Grundfläche in Spaltenrichtung von 5 mm und in Zeilenrichtung von 10 mm erreicht (Dunkelstrahler II). Die Heizwendeln wurden in Richtung der langen Seite des Rechtecks verlegt. Die Abstände der mechanisch parallel liegenden Heizwendelteile wurden gleich und möglichst klein zu 5 mm gewählt, um eine homogene Wärmeabstrahlung zu erreichen. Die Heizwendeln wurden auf ihrer Kante stehend eingebaut, so wie auch original im Glas-keramikkochfeld. Damit ist die große Seitenfläche der Heizwendel nicht in Richtung der MTP gerichtet. Die Erwärmung mit einer Heizzeit von 16 s, einer Leistung von 367 W und Start bei 24.2°C eines über diesem Strahler angeordneten Kunststoffrahmens mit Nunc-strips ohne Aluminiumblock, ohne Schütteln und ohne Bewegen ergibt Homogenitäten von bis zu 1°C. Dabei ist die Spaltenhomogenität mit 1...1.2°C schlechter als die Zeilenhomogenität mit 0.6...0.7°C. In Spaltenrichtung ist ein Wärmeberg zu verzeichnen: Die Zeilen A,B,G,H sind zu kalt. Um Konvektion als Fehlerquelle auszuschließen, wurde an die Längsseiten Glas-faserwolle angebracht. Diese Maßnahme brachte keinen Erfolg. Die Spaltenhomogenität bleibt schlecht. Als nächstes wurde der Kunststoffrahmen der Nunc-strips gegenüber dem Strahler um 90° gedreht, um in Spaltenrichtung einen deutlich längeren Strahler zu erreichen. Die mittleren Spalten sollten bei dieser Anordnung eine bessere Homogenität aufweisen. Diese Erwartung erfüllt sich nicht. Die entstehende Temperaturverteilung ist zwar die erwartete (mittlere Spalten warm, Rest kalt), jedoch ist die Homogenität der mittleren Spalten schlechter als 1°C. Mit einer manuellen Bewegung des Strahlers über den Nunc-strips hin und her und Schütteln während des Aufheizens kann ohne Aluminiumblock eine Homogenität von 0.6...0.7°C erreicht werden. Setzt man die Nunc-strips in einen Aluminiumblock ein, verbessern sich die Homogenitäten ohne Bewegen während des Aufheizens auf bis zu 0.25°C. Weiterhin hat sich gezeigt, daß die entstehende Homogenität beim manuellen Verschieben des Strahlers schlechter werden kann als die Homogenität ohne Bewegung des Strahlers. Manuelles Verschieben hat den Nachteil, daß eine Änderung der Geschwindigkeit des Strahlers nicht sicher verhindert werden kann.

Die nächsten Versuche wurden mit einem Strahler durchgeführt, der mit einer Größe von 19.5·13 cm² die MTP in beiden Richtungen deutlich überragt und günstig verschiebbar ist (Dunkelstrahler III). Seine Heizwendeln wurden so befestigt, daß deren große Seitenflächen in Richtung der MTP zeigen. Die Einbettung in eine hitzefeste Masse wie bei den beiden vorher verwendeten Strahlern entfällt zugunsten einer geringeren Aufheizzeit. Die Heizwendeln verlaufen parallel zur längeren Strahlerseite. Zur Vermeidung eines Wärmebergs in der Mitte des Strahlers wurden die Abstände der Heizwendeln in Richtung der kürzeren Strahlerseite in der Mitte zu 10 mm und am Rand zu 5 mm mit gleitendem Übergang gewählt. Der gleitende Übergang ist wegen des Verlaufs der Heizwendeln nur in dieser Richtung möglich. Das manuelle Verschieben des Strahlers erfolgt in Richtung seiner längeren Seite. Damit soll der Wärmeberg in dieser Richtung ausgeglichen werden.

Zuerst wurden die Erwärmungseigenschaften von Aqua dest und einer TRIS-Kresolrot-Lösung untersucht. Dazu wurde in eine Kunststoffwanne von der Größe einer MTP Aqua dest gefüllt. Der Strahler wurde mit einer Leistung von 453 W gespeist und 21 mm über der Wanne positioniert. Während des Erwärmens wurde geschüttelt. Aus der Aufheizzeit von 75 s, dem erreichten Temperaturanstieg von 14.7°C und der Schichtdicke von 0.75 cm ergibt sich eine für die Erwärmung wirksame Strahlungsleistungsdichte von

$$S = 6.15 \text{ mW/mm}^2 \quad (3.1).$$

Der gleiche Versuch wurde mit einer TRIS-Kresolrot-Lösung in der gleichen Wanne wiederholt. Mit 54.4 s, 11.4°C und 0.85 cm ergeben sich 7.5 mW/mm². In einem weiteren Versuch mit einer anderen Wanne, der gleichen TRIS-Kresolrot-Lösung, einer Heizzeit von 50.6 s, einem Temperaturunterschied von 16.55°C und einer Schichtdicke von 0.46 cm wurden 6.3 mW/mm² ermittelt. Unter Voraussetzung eines Emissionsvermögens von $\varepsilon=0.96$ für Aqua dest [o.V. Pyrovar-System] und der Transmission von Wasser lt. Abb. D1 kann daraus die Strahlertemperatur bestimmt werden. Im Planckschen Strahlungsgesetz der spektralen spezifischen Ausstrahlung eines schwarzen Körpers

$$M_{\lambda s} = \frac{C_1}{\lambda^5 \cdot (e^{\frac{C_2}{\lambda \cdot T}} - 1)} \quad (3.2)$$

mit $c_1=3.741832 \cdot 10^{-16} \text{ W/m}^2$ und $c_2=1.438786 \cdot 10^{-2} \text{ K} \cdot \text{m}$ [v. Ardenne u.a. 1988 S.697] muß die Temperatur T so bestimmt werden, daß bei Integration des Produktes aus $M_{\lambda s}$ und der Absorption $A_{\text{Wasser}}(\lambda)$ über alle Wellenlängen

$$\int_{\lambda=0}^{\infty} M_{\lambda s} \cdot A_{\text{Wasser}}(\lambda) d\lambda = S \quad (3.3)$$

die im Wasser wirksame Leistungsdichte $S=6.15 \text{ mW/mm}^2$ aus Ergebnis (3.1) herauskommt. Eine Entfernungsabhängigkeit existiert nicht. Es ergibt sich

$$T = 574 \text{ K} \quad (3.4).$$

Mit Ergebnis (3.4) und dem Wienschen Verschiebungsgesetz ergibt sich die größte Leistungsdichte des Strahlers im Wellenlängenbereich 2...8 µm. Die Absorption von Aqua dest geht in das Ergebnis (3.4) praktisch nicht ein, da sie aufgrund der Schichtdicke sehr dicht an 1 liegt.

In den Abb. 3.10 und 3.11 werden die Ergebnisse zweier Aufheizversuche gezeigt. Der Unterschied zwischen dem oberen und dem unteren Bild besteht in der beim unteren Bild beim Aufheizen um 180° gedrehten MTP.

Es ist ein starker Gradient in Spaltenrichtung zu verzeichnen. Die Homogenität in Spaltenrichtung beträgt 0.4...0.7°C. Das ist genau die Richtung, in der der Wärmeberg durch verschiedene Abstände der Heizwendeln ausgeglichen werden sollte. In Zeilenrichtung ist der Gradient kleiner. Hier beträgt die Homogenität 0.2...0.4°C.

Zur Untersuchung der Homogenität des Strahlers wurde eine Wanne mit TRIS-Kresolrot-

Lösung unter den Strahler gestellt und der Temperaturverlauf während des Aufheizens in der Mitte der Wanne und in der Position B2 aufgezeichnet. Dabei wurde die Wanne nicht geschüttelt und der Strahler nicht bewegt. Der gleiche Versuch wurde mit den drei anderen Eckpositionen durchgeführt. Am Ende der Aufheizzeit von 60 s bei einer Leistung von 453 W ergibt sich eine um bis zu 1.15°C höhere Temperatur in der Mitte der Wanne als an den Eckpositionen.

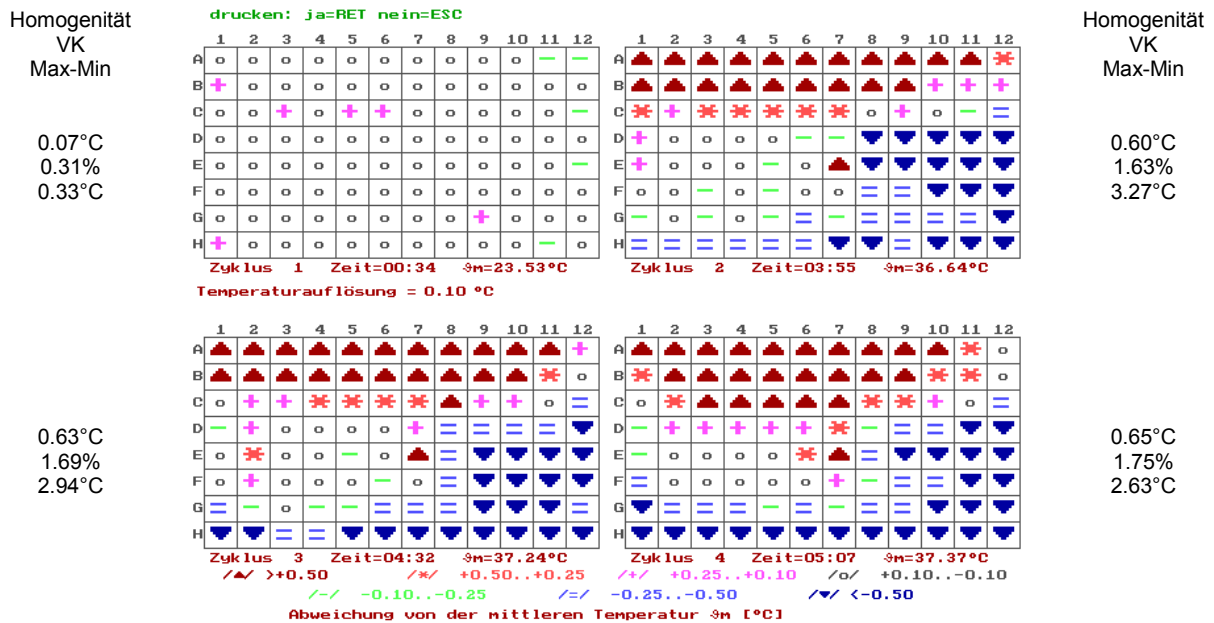


Abb. 3.10: Aufheizung von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=8.03 bei 21.4°C in Greiner F-MTP 25 mm unter dem Dunkelstrahler III, Leistung 453 W, ohne Bewegung, mit randabdeckendem Aluminiumrahmen, mit Schütteln, 41 s Heizzeit, ohne homogenisierenden Aluminiumblock, Reader auf 40°C vorgeheizt, Zyklus 1= Ausgangszustand bei Raumtemperatur, Heizwendeln verlaufen parallel zu den MTP-Zeilen

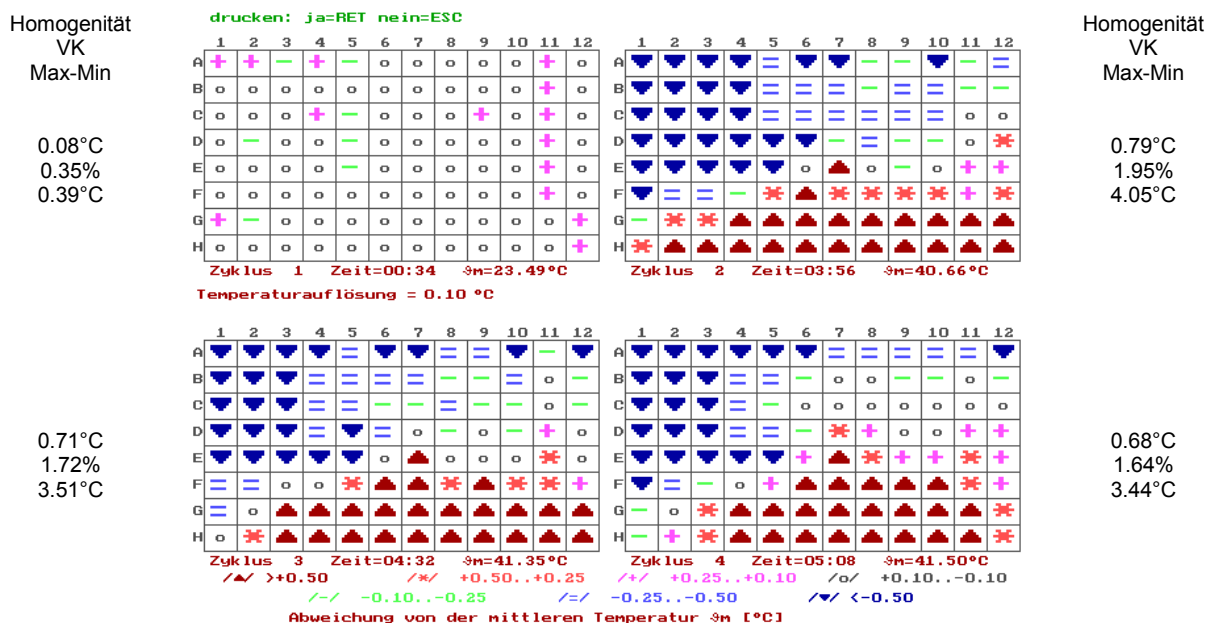


Abb. 3.11: wie Abb. 3.10, jedoch 60 s Heizzeit, MTP gegenüber Abb. 3.35 beim Aufheizen um 180° gedreht

Auf die MTP aufgeklebte Folien verziehen sich und werden wellig beim Aufheizen. Das gleiche gilt für Nunc-strips im formschlüssigen Aluminiumblock.

Über die Zuleitungen des Fühlers, der sich zur Kontrolle der Welltemperatur in einem mittleren Well befindet, gelangt Wärme in das Well hinein. Bei 250 µl TRIS-Kresolrot-Lösung in Greiner F-MTP, 57 s Heizzeit und 453 W elektrische Leistung ergibt sich dadurch eine Temperaturerhöhung von 1.4...2.7°C.

Bei der Aufheizung einer befüllten MTP tritt ohne weitere Maßnahmen der Effekt der zu heißen Randwells auf. Bei symmetrisch unter dem Strahler liegender MTP mit 250 µl TRIS-Kresolrot-Lösung, 50 s Heizzeit und 453 W elektrischer Leistung werden die 36 Randwells um 1...2°C wärmer als die 60 inneren. Auch bei Nunc-strips im Kunststoffrahmen werden die Randwells wärmer als die inneren, jedoch nicht so deutlich.

Die Untersuchung ergibt, daß der Effekt unabhängig vom Reader ist. Das Ein- und Ausschalten der Dachheizung hat keinen Einfluß. Er ist reversibel. Die Differenzen verschwinden mit der Abkühlung. Er ist reproduzierbar. Läßt man die 36 Randwells der MTP unbefüllt, so verhalten sich die zweitinnersten Wells wie vorher die Randwells. Sie werden wärmer als die noch weiter innen liegenden.

Zur Vermeidung dieses Effekts hat es sich als vorteilhaft erwiesen, mit einem Rahmen die Ränder der MTP abzudecken. Der Rahmen soll möglichst nicht absorbieren, weil das wiederum den MTP-Rand erwärmt. Die Verwendung von Aluminium ist möglich. Der Ausschnitt für die MTP ist so groß gewählt worden, daß die vom Strahler aus sichtbare MTP-Materialfläche für ein Randwell so groß ist wie für ein inneres Well. Bei den Aufheizversuchen nach Abb. 3.10 und 3.11 wurde ein solcher Rahmen verwendet. Sein Einsatz bringt keine wesentliche Verbesserung der Homogenität, weil Temperaturgradienten existieren.

Dunkelstrahler	Bewegung	Homogenität	VK Zyklus 4...2	Bestrahlungszeit	Erwärmungsgeschwindigkeit
I	ohne	2.1...2.3°C	6.1...6.5 %	10 s	1.48°C/s
	mit	0.8...0.9°C	2.1...2.4 %	16 s	0.70°C/s
II	ohne	1.9...2.0°C	4.2...4.4 %	62 s	0.29°C/s
	mit	0.6...1.0°C	1.9...2.9 %	30 s	0.23°C/s
III	ohne	1.7...1.9°C	5.0...5.8 %	29 s	0.52°C/s
	mit	3.0...3.3°C	7.1...7.6 %	60 s	0.40 °C/s

Tabelle 3.5: Homogenität, VK über die ganze MTP, Bestrahlungszeit und Erwärmungsgeschwindigkeit beim Aufheizen von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=8.03 bei 21.4°C in Greiner F-MTP ohne homogenisierenden Aluminiumblock mit verschiedenen Dunkelstrahlern ohne Folie ohne randabdeckenden Rahmen

Durch die lang andauernde IR-Bestrahlung werden die MTP so stark mechanisch beschädigt, daß ihre weitere Benutzung ausgeschlossen werden muß. Eine abdeckende Lochmaske verhindert den Wärmeeintrag in die MTP-Oberfläche nicht genügend stark. Die

Temperatur der MTP aus dem Werkstoff PS erreicht bei 250 µl TRIS-Kresolrot-Lösung, 70 s Heizzeit, 453 W Leistung ohne abdeckende Lochmaske 137°C, mit ihr 74°C. Versuchshalber eingesetzte autoklavenfeste MTP aus dem Werkstoff Polypropylen (Abk. PP) zeigen dagegen keine sichtbaren Wärmeschäden. Die Lösung der Aufgabenstellung kann jedoch nicht in dieser Richtung erfolgen.

Die beste mit dem Dunkelstrahler III jemals erreichte Homogenität liegt ohne Bewegung und ohne homogenisierenden Aluminiumblock mit randabdeckendem Rahmen bei 0.39°C bzw. ohne randabdeckenden Rahmen bei 0.52°C in dem nach Ende des Aufheizens gemessenen Zyklus (Zyklus 2).

Dunkelstrahler	Bewegung	Homogenität	VK Zyklus 4...2	Bestrahlungszeit	Erwärmungs- geschwindigkeit
I	ohne	0.15...0.60°C	0.4...1.6 %	35 s	0.38°C/s
	mit	0.20...0.40°C	0.5...1.1 %	75 s	0.19°C/s
II	ohne	0.25...0.60°C	0.8...1.9 %	23 s	0.20°C/s
	mit	0.16...0.28°C	0.5...0.6 %	115 s	0.09°C/s
III	ohne	0.20...0.35°C	0.7...1.1 %	90 s	0.15°C/s
	mit	0.16...0.27°C	0.5...0.8 %	150 s	0.09°C/s

Tabelle 3.6: Homogenität, VK über die ganze MTP, Bestrahlungszeit und Erwärmungsgeschwindigkeit beim Aufheizen von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.98 bei 21.9°C in Nunc-strips im homogenisierenden Aluminiumblock mit verschiedenen Dunkelstrahlern ohne Folie ohne randabdeckenden Rahmen

Die Tabellen 3.5 und 3.6 zeigen zusammengefaßt die erreichten Homogenitäten, VK und Aufheizgeschwindigkeiten der drei verwendeten Dunkelstrahler I, II, III, jeweils mit und ohne Bewegung des Strahlers beim Aufheizen und ohne einen (Tabelle 3.5) sowie mit einem (Tabelle 3.6) homogenisierenden Aluminiumblock.

Weiterhin wurde der Versuch unternommen, eine Homogenisierung der abgestrahlten Leistungsdichte über die MTP durch einen flächigen, metallischen Strahler zu erreichen. Dabei wurden Drähte elektrisch hitzefest isoliert zwischen zwei 2 mm starke Aluminiumplatten der Größe 195·110 mm² gebracht. Die Aluminiumplatten wurden hitzefest schwarz eloxiert, um einen hohen Emissionskoeffizienten zu erreichen. Sie sollen durch ihre Dicke eine Wärmeleitung im Strahler bewirken, um eine Homogenisierung vor der Abstrahlung zu erreichen. Dabei wurde bewußt in Kauf genommen, daß die dem Strahler eigene Aufheizzeit drastisch ansteigt, da die Aluminiumplatten erst erwärmt werden müssen. Insofern stellt dieser Strahler einen Schritt in Richtung konventionelle Kochplatte eines Elektroherdes dar. Der Strahler wurde mit einer elektrischen Leistung von 480 W gespeist. Er wurde 25 mm über MTP positioniert. Nach einer Aufheizzeit von 10 min betrug die Temperatur an der Unterseite 360°C. Nach 60 s Heizzeit wurden 12.01°C Temperaturerhöhung im Well erreicht. Die erreichte Homogenität beträgt 0.8°C. Dabei wurde die MTP symmetrisch ohne homo-

genisierenden Aluminiumblock unter den Strahler gelegt und beim Aufheizen geschüttelt. Es ist ein unsymmetrischer Wärmeberg zu verzeichnen. Auch der Effekt der zu warmen Randwells tritt auf, wird aber von dem Wärmeberg überdeckt.

Es ist unbedingt von Vorteil, vor dem Aufheizversuch die MTP wenigstens 10 min auf einem Aluminiumblock stehen zu lassen, damit der Ausgangszustand vor der Temperierung eine gute Homogenität aufweist. Es findet eine Homogenisierung mittels Wärmeleitung durch die Wellböden hindurch über den Aluminiumblock statt. Dazu müssen die Wellböden exakt aufgesetzt sein. Das Aufsetzen des MTP-Randes reicht nicht. Erreichbar sind $0.06 \dots 0.08^\circ\text{C}$. Für Nunc-strips funktioniert das nicht so gut, denn diese weisen an ihrer Unterseite eine Kante auf, die das Aufsetzen der Wellböden verhindert. Ein solcher Aluminiumblock zur Homogenisierung ist beim Aufheizen nicht annähernd so wirkungsvoll.

Die Aufheizzeit zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Heizleistung. Mit 460 W Heizleistung beim Dunkelstrahler I liegt die Aufheizzeit mit 16 s bereits weit unterhalb der geforderten 1...2 min. Eine weitere Erhöhung der Heizleistung erscheint zum Zweck der Verringerung der Aufheizzeit nicht sinnvoll. Es konnte keine eindeutige Abhängigkeit der benötigten Aufheizzeit vom Abstand Well-Dunkelstrahler I festgestellt werden. Dies ist durch seine Abmessungen erklärlich. Er hat einen Durchmesser von 18 cm, die MTP bzw. der Kunststoffrahmen der Nunc-strips mißt über die Diagonale aber nur 15 cm, d.h., alle Wells befinden sich innerhalb des Durchmessers. Da der Abstand der Wells vom Dunkelstrahler I klein gegenüber dessen Durchmesser ist, kann hier noch keine Abhängigkeit von der Entfernung wirksam sein. Eine erwartete Zunahme der benötigten Aufheizzeit wegen Abnahme der Leistungsdichte proportional dem Quadrat der Entfernung wirkt erst, wenn die Entfernung der Wells zum Strahler ein Mehrfaches dessen Durchmessers beträgt. Die Temperaturverteilung in der MTP stellt eine Abbildung der geheizten und nicht geheizten Fläche des Strahlers dar. Die nicht geheizten Flächen sind deutlich kälter als die geheizten, d.h., die Wärmestrahlung ist praktisch senkrecht zur Strahlerebene und nicht auch schräg gerichtet. Das stimmt mit den von der Entfernung fast unabhängigen Heizzeiten überein (Abb. 3.9).

Die Ursache für die schlechte Homogenität in Spaltenrichtung beim Dunkelstrahler II ist in der lokal verschiedenen wirksamen Leistungsdichte in der Ebene der MTP zu suchen, da Konvektion ausgeschlossen wurde.

Schlechte Homogenitäten bei manuellem Bewegen des Strahlers haben ihre Ursache in der Unzulänglichkeit einer solchen Bewegung: ungleichmäßige Geschwindigkeiten, z.B. infolge verschiedener Reibung, führen zu positionsabhängig verschiedenen Energieeinträgen in jedem Well.

Die ermittelten wirksamen Leistungsdichten für Wasser und eine TRIS-Kresolrot-Lösung liegen praktisch zusammen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß bei der Er-

wärmung von Lösungen mit IR-Strahlern niedriger Temperatur die Absorption des Wassers maßgebend ist. Die durch die gelösten Stoffe hervorgerufene Absorption spielt keine erkennbare Rolle. Von daher ist die Erwärmung unabhängig vom Analysengut.

Die mit Ergebnis (3.4) für den Dunkelstrahler III erhaltene Strahlertemperatur von 574 K ist kleiner als die wahre Temperatur T_{wahr} der Heizwendeln, weil nicht die Gesamtfläche A_{gesamt} strahlt, sondern nur die beheizte Fläche A_{beheizt} . Sieht man die ermittelte als eine effektive Strahlertemperatur T_{effektiv} an, da sie aus der Leistungsdichte im Wasser ermittelt wurde, kann die wahre Strahlertemperatur mit Hilfe des Verhältnisses aus beheizter und Gesamtfläche von 48% abgeschätzt werden. Voraussetzungen: a) Der Emissionskoeffizient ε ist im betrachteten Temperatur- und Wellenlängenbereich konstant; b) Die Umgebung ist viel kälter als der Strahler; c) Die Absorption in Wasser ist für Strahler beider Temperaturen nur unwesentlich verschieden; d) Die beheizte Fläche ist gleichmäßig über die Gesamtfläche verteilt. Unter diesen Voraussetzungen ist die von der beheizten Fläche abgestrahlte Leistung mit wahrer Strahlertemperatur so groß wie die von der Gesamtfläche abgestrahlte Leistung mit effektiver Strahlertemperatur:

$$T_{\text{effektiv}}^4 \cdot A_{\text{gesamt}} = T_{\text{wahr}}^4 \cdot A_{\text{beheizt}} \quad (3.5)$$

Die effektive Strahlertemperatur entspricht der in Ergebnis (3.4) erhaltenen, also $T_{\text{effektiv}}=574$ K. Mit $A_{\text{beheizt}}/A_{\text{gesamt}}=0.48$ folgt mit Gleichung (3.5) $T_{\text{wahr}}=690$ K. Mit dieser Berechnung stimmt überein, daß bei geringfügiger Erhöhung der eingespeisten Leistung eine sehr schwache dunkle Rotglut der Heizwendeln sichtbar wird. Dies tritt nach [Wanke u.a. 1961 S.240] bei $550^\circ\text{C}=823$ K auf.

Weiterhin wurde eine Berechnung des Verhältnisses der beteiligten Leistungsdichten von Wärmeleitung und Wärmestrahlung vorgenommen, um festzustellen, welcher Anteil wie stark beteiligt ist.

Die Strahlungsleistungsdichte S auf der Oberfläche der Lösung im Well setzt sich zusammen aus einem Strahlungsanteil $\varepsilon \cdot \sigma \cdot T^4$, einem Leitungsanteil $(T - T_{\text{Lösung}})/(R_{\text{th}} \cdot A)$ und einem abzüglichen Anteil für die Abstrahlung $\varepsilon_{\text{Wasser}} \cdot \sigma \cdot T_{\text{Lösung}}^4$ von der Welloberfläche, deren Temperatur für diese Berechnung mit $T_{\text{Lösung}}=303$ K angesetzt wird. Der Emissionskoeffizient beträgt nach [o.V. Pyrovar-System] $\varepsilon_{\text{Wasser}}=0.96$ für Aqua dest bei 20°C . Der thermische Widerstand R_{th} der Luftschicht wird nach $R_{\text{th}}=l/(\lambda \cdot A)$ berechnet, wobei l die in Ausbreitungsrichtung der Wärme liegende Strecke von 21 mm ist und λ der Wärmeleitwert der Luft von 0.0244 W/(m·K). Die Konvektion wird aufgrund des großen Überhangs des Strahlers über die MTP vernachlässigt. Die Erwärmung der Luft infolge Absorption wird ebenfalls vernachlässigt, da Luft im Wellenlängenbereich von 0 bis 100 μm bei einem Weg von $l=21$ mm und einer wahren Strahlertemperatur von 690 K nur $0.48 \cdot 0.49$ $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ absorbiert. Das Transmissionsspektrum von Luft wurde [Bleicher 1986 S.18] entnommen. Die Leistungsdichte

durch Absorption in Luft ist somit um vier Größenordnungen kleiner als die Strahlungsleistungsdichte S nach Gleichung (3.1). Es entsteht

$$S + \varepsilon_{\text{Wasser}} \cdot \sigma \cdot T_{\text{Lösung}}^4 = \varepsilon \cdot \sigma \cdot T^4 + (T - T_{\text{Lösung}}) \cdot \lambda / l \quad (3.6).$$

Auf der linken Seite stehen die für die Erwärmung wirksame Strahlungsleistungsdichte S nach Ergebnis (3.1) und die durch die Lösungsoberfläche abgestrahlte Leistungsdichte $\varepsilon_{\text{Wasser}} \cdot \sigma \cdot T_{\text{Lösung}}^4 = 0.46 \text{ mW/mm}^2$; auf der rechten Seite stehen die zur Verfügung stehenden Leistungsdichten durch Strahlung und Leitung. Gibt man ε als Unabhängige vor, entsteht ein Polynom 4. Ordnung in T , dessen Nullstellen nach L. Ferrari (1522-1565), entnommen aus [Gehlert u.a. 1965 S.112], bestimmt wurden.

Die folgende Tabelle 3.7 zeigt den Anteil der Leistungsdichten von Strahlung und Leitung sowie die effektive Strahlertemperatur. Es ist deutlich zu sehen, daß der größte Teil der für die Erwärmung wirksamen Leistungsdichte von der Strahlung kommt, solange nur ε nicht weit unter 0.1 liegt. Damit ist die genaue Kenntnis des Emissionskoeffizienten ε nicht von Bedeutung, da er lt. Gleichung (3.6) und Tabelle 3.7 stark variieren kann, ohne daß sich die Strahlertemperatur übermäßig ändert.

Emissionskoeffizient	Strahlungsanteil	Leistungsanteil	effektive Strahlertemperatur
0	0 %	100 %	5991 K
0.1	87.6 %	12.4 %	1005 K
0.2	90.4 %	9.6 %	852 K
0.3	91.7 %	8.3 %	773 K
0.4	92.6 %	7.4 %	721 K
0.5	93.3 %	6.7 %	683 K
0.6	93.8 %	6.2 %	653 K
0.7	94.3 %	5.7 %	629 K
0.8	94.6 %	5.4 %	609 K
0.9	94.9 %	5.1 %	592 K
1	95.2 %	4.8 %	577 K

Tabelle 3.7: Anteil der Leistungsdichten von Strahlung und Leitung an der Erwärmung der Lösung im Well sowie effektive Strahlertemperatur in Abhängigkeit des Emissionskoeffizienten ε nach Gleichung (3.6); $T_{\text{Lösung}}=303 \text{ K}$, $l=21 \text{ mm}$. Die zweite reelle Lösung von Gleichung (3.6) ist negativ und hat keine technische Bedeutung. Die dritte und vierte Lösung von Gleichung (3.6) sind komplex und haben ebenfalls keine technische Bedeutung. Luft hat auch eine Zeitkonstante: $\tau_{\text{Luft}}=R_{\text{th}} \cdot C_{\text{th}}=(l/(\lambda \cdot A)) \cdot m \cdot c=l^2 \cdot c \cdot \rho / \lambda =23.6 \text{ s}$ für $l=21 \text{ mm}$; d.h., der Wärmeleitungsanteil über die Luft verhält sich wie ein Tiefpaß 1. Ordnung. Bei gegenüber τ_{Luft} kleiner Aufheizzeit liegt der Leistungsanteil unter dem in dieser Tabelle angegebenen Wert. Dieses Tabelle wurde für den eingeschwungenen Zustand gerechnet.

Das liegt an dem verschieden starken Einfluß beider Größen: ε geht linear in den Term ein, in dem T zur 4. Potenz steht. Weiterhin ist zu sehen, daß selbst für $\varepsilon=1$ die berechnete effektive Strahlertemperatur größer ist als mit Ergebnis (3.4) erhalten, was an der dort nicht

berücksichtigten Wärmeabstrahlung durch die Lösungsoberfläche liegt. Die effektive Strahlertemperatur beträgt nach Tabelle 3.7 mindestens 577 K. Mit der Rotglutabschätzung ($T_{\text{wahr}} < 823 \text{ K}$) und Gleichung (3.5) folgt $T_{\text{effektiv}} < 664 \text{ K}$. Da der Emissionskoeffizienten ε sicher unter 1 liegt, aber auch noch keine Rotglut vorliegt, wird als ungefähre effektive Strahlertemperatur der Wert 620 K festgelegt. Das entspricht nach Gleichung (3.5) einer wahren Strahlertemperatur von 745 K. Mit diesem Ergebnis und dem Wienschen Verschiebungsgesetz wird die Wellenlänge der maximalen spektralen spezifischen Ausstrahlung ermittelt:

$$\lambda_{\text{M}\lambda\text{s,max}} = 2897.8 \text{ K}\cdot\mu\text{m}/745 \text{ K} \approx 3.9 \mu\text{m} \quad (3.7).$$

Weiterhin ist aus Tabelle 3.7 zu entnehmen, daß bei einer effektiven Strahlertemperatur von 620 K der Anteil der Wärmeleitung etwa 5.6 % beträgt. Mit größerer Luftweglänge l nimmt der Anteil der Wärmeleitung ab. Für $l=84 \text{ mm}$ beträgt er unter sonst gleichen Bedingungen nur noch 1.4 %. Da das Verhältnis aus der gewünschten Homogenität der Lösungstemperatur und der gewünschten Temperaturänderung beim Aufheizen noch kleiner ist, nämlich $0.1^\circ\text{C}/15^\circ\text{C} \approx 0.67 \%$, ist darauf zu achten, daß bei einer derartigen Strahlungsquelle keine Zugluft zwischen Strahler und MTP gelangen kann. Die dort befindliche erwärmte Luft darf nicht durch Luft anderer Temperatur ersetzt werden. Deshalb muß die konstruktive Ausführung der Umgebung von MTP und Strahler so ausgeführt werden, daß die erwärmte Luft nicht ausgetauscht werden kann. Um diesen Störeinfluß zu minimieren, kann das Volumen rund um MTP und Strahler, in dem die Erwärmung stattfindet, abgeschlossen werden. Die prinzipiell nicht gleichzeitig mögliche Erwärmung und Messung erfordert ein weiteres abgeschlossenes Volumen, die Meßkammer. Nach dem Beenden der Erwärmung wird die MTP dorthin transportiert und das Analysengut vermessen. Zum Erhalt der erreichten Lösungstemperatur während der Messung muß die Meßkammer auf die gewünschte Lösungstemperatur vortemperiert worden sein. Die nähere Ausführung eines solchen Gerätes wird in AZ 199 08 745.8 [Horn u.a. 1999/1] beschrieben.

Die in Abb. 3.10 gezeigten Temperaturverteilungen weisen eine unerwartet schlechte Homogenität in Spaltenrichtung auf. Gerade in diese Richtung sollte der Wärmeberg durch einen ungleichmäßigen Abstand der Heizwendeln ausgeglichen werden. Durch Drehen der MTP um 180° in einem weiteren Aufheizversuch (Abb. 3.11) konnte der Gradient dem Strahler zugeordnet werden, da er sich bei gleicher Lage im Reader mit der MTP mitgedreht hat. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem mittels einer Wanne nachgewiesenen Wärmeberg. Dabei zeigte jede der vier Eckpositionen eine um bis zu 1.15°C niedrigere Temperatur gegenüber der Mittenposition während des Aufheizens, wobei nicht geschüttelt wurde. Schütteln verwischt die Temperaturdifferenzen in der Wanne. Während der Abkühlphase, ebenfalls ohne Schütteln, lagen die Temperaturen von Eck- und Mittenposition viel besser zusammen, woraus geschlußfolgert wird, daß die Differenzen tatsächlich auf den Energieeintrag des Strahlers zurückzuführen sind.

Weiterhin konnte festgestellt werden, daß über die beiden Drähte des Temperaturfühlers Wärme in das Referenzwell eingeleitet wird. Diese zusätzliche Wärme macht bei 250 µl Wellinhalt eine Temperaturdifferenz von +1.4...+2.7°C gegenüber den umliegenden Wells aus. Daraus folgt, daß ggf. der Temperaturfühler aus dem Referenzwell zu entfernen ist oder das Referenzwell aus der Statistikrechnung ausgeschlossen werden muß.

Das Erwärmen der MTP mit einem IR-Strahler führt nicht nur zu einer Absorption im Well, sondern auch zu einer Absorption direkt in der MTP, vorzugweise in der Fläche parallel zum Strahler. Das ist die Oberseite der MTP. Sie wärmt sich stark auf, leitet die Wärme aufgrund ihrer geringen Dicke aber nur langsam weiter. Daher werden alle Wells nicht nur über die o.g. Mechanismen Strahlung und Wärmeleitung über Luft mit Wärme versorgt, sondern auch noch über Wärmeleitung von der MTP-Oberfläche aus. Der Effekt stört, weil die Randwells besonders stark betroffen sind. Sie müssen die Wärme aus dem breiten Randbereich der MTP aufnehmen. Die 36 Randwells haben also eine größere "zugeordnete" MTP-Oberfläche als die 60 Innenwells. Läßt man nun die 36 Randwells unbefüllt, wirkt die zweitinnerste Reihe als Randreihe und wird entsprechend wärmer, aber nicht ganz so stark, da die Wärmeleitung vom Rand zur zweitinnersten Reihe durch die jetzt leeren Randwells behindert wird. Die Aufheizung der MTP-Oberfläche und des MTP-Randes führen dort zu solch hohen Temperaturen, daß PS-MTP irreversibel beschädigt werden. Die Geometrie und die Transmission der MTP werden beeinträchtigt.

Bei PS-MTP wird die meiste Energie vom MTP-Material im Wellenlängenbereich 3...5 µm absorbiert. Es ist ungünstig, daß das Maximum der spektralen spezifischen Ausstrahlung nach Gleichung (3.7) und der Absorptionsbereich von PS praktisch zusammenfallen. Aus den für Abb. 3.12 verwendeten Daten läßt sich die Leistungsdichte in PS und PP bestimmen. Sie beträgt im Wellenlängenbereich 0.1...20 µm für PS 7.2 mW/mm² und für PP 6.1 mW/mm². Die dadurch erzeugte Wärme gelangt mittels Wärmeleitung nach und nach in die Lösung und beschädigt vorher die PS-MTP.

Ein den MTP-Rand abschirmender Rahmen führt nicht zur vollständigen Beseitigung des Randeffektes. Der Rahmen heizt sich mit auf und erwärmt dadurch die MTP wieder, wenn auch nicht so stark. Das Bekleben des Rahmens mit weißem Papier zur Verringerung von Absorption und Emission zeigt keinen Erfolg. Der Rahmen wird trotzdem warm.

Zu der für PS ungünstig liegenden Leistungsverteilung des IR-Strahlers kommt hinzu, daß die Heizwendeln frei hängen und so leicht äußeren Kräften und der Verlängerung durch Eigenerwärmung nachgeben. Aus diesen Gründen wurde ein IR-Strahler gesucht, der a) ein Spektrum hat, das die MTP nicht beschädigt, aber trotzdem die Lösung aufheizt; der b) mechanisch stabiler aufgebaut ist, auch wegen der Praktikabilität; und c) wenigstens in einer Richtung eine homogene Leistungsdichteverteilung aufweist.

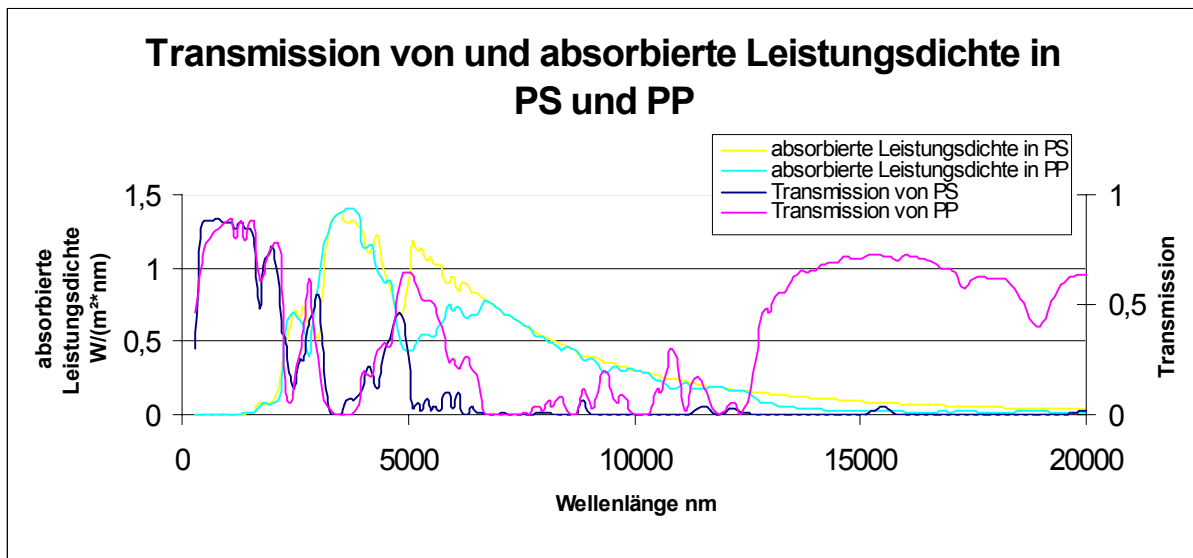


Abb. 3.12: Transmissionsspektren von PS (Stärke=1.2 mm) und PP (Stärke=1.0 mm) sowie absorbierte Leistungsdichte eines Strahlers mit 745 K, aber nur dem 0.48-fachen entspr. $A_{\text{beheizt}}/A_{\text{gesamt}}$ dessen spektraler spezifischer Ausstrahlung. Die Transmissionsspektren von PS und PP wurden mit einem Spektrometer System 2000 und einem Spektrometer Lambda 19 gemessen.

Aus den Überlegungen zur spektralen Verteilung folgt, daß die Strahlertemperatur erhöht werden muß, damit in dem Wellenlängenbereich, in dem PS absorbiert, keine nennenswerte Leistung mehr abgestrahlt wird. Die nächstheißeren praktisch verwendbaren Strahler für Infrarot, Abk. IR, sind Halogenlampen in Form von Stäben, wie sie in kräftigeren Leuchten eingebaut sind. Damit wird der Gedanke an einen in zwei Dimensionen homogenen Strahler verlassen. Die Homogenität in der Dimension parallel zum Halogenstab muß durch die Länge des Halogenstabes erreicht werden. Die Homogenität in der Dimension senkrecht zum Halogenstab muß durch Bewegen des Strahlers relativ zur MTP erreicht werden.

Ein anderer Typ IR-Strahler niedrigerer Temperatur sind Globare. Bei ihnen handelt es sich um durch direkte Widerstandserwärmung erhitzte Stäbe von z.B. 6 mm Durchmesser und 105 mm Länge. Der als Strahler benutzte Bereich des Globars befindet sich in seiner Mitte. Der außerhalb liegende Bereich dient lediglich der niederohmigen Stromzuführung zum Strahler und besteht aus Graphit. Der strahlende Bereich in der Mitte ist nur etwa 25 mm lang. Die Nenntemperatur liegt bei einigen Hundert Grad Celsius. Im Wellenlängenbereich von etwa 1 bis 10 μm sind Globare als schwarze Strahler ($\epsilon \approx 1$) verwendbar. Sie werden als Strahlungsquelle in IR-Spektrometern eingesetzt. Aufgrund der im Vergleich zu einer MTP relativ kleinen Länge des strahlenden Bereiches kann eine Homogenität der ausgesendeten Strahlung in der Größenordnung der MTP-Abmessungen nicht erwartet werden.

Für das Prinzip der Erwärmung durch IR-Strahlung sind prinzipiell auch die konventionellen Kochplatten eines Elektroherdes brauchbar. Da solche Kochplatten außer der Heizwendel

sehr viel Masse zu erwärmen haben, dauert das Erreichen der Endtemperatur etwa 10 min. Sie haben eine große Wärmekapazität. Den größten Anteil der umgesetzten Energie braucht die Kochplatte zu ihrer eigenen Erwärmung. Aus diesem Grund wurden konventionelle Kochplatten nicht näher untersucht, obwohl die die Heizwendel umgebende Masse der Homogenisierung der abgestrahlten Leistung dienlich ist. Ein durchgeführter Versuch ergab, daß mit einer Leistung von 1400 W, einer Vorheizzeit von 10 min, einem Aluminiumblock als Träger der Nunc-strips, einer Starttemperatur von 25°C, einem Lösungsvolumen von 250 µl Aqua dest je Well und 15 s Bestrahlung von unten die Welltemperaturen je nach Wellposition zwischen 39 und 45°C lagen. Die Aufheizzeit ist ausreichend niedrig. Die große Vorheizzeit infolge hoher Wärmekapazität und die schlechte Homogenität am Ende der Aufheizzeit sind nicht tragbar.

3.2.2. Erwärmung durch Halogenstrahler (Hellstrahler)

Halogenstrahler haben eine so hohe Oberflächentemperatur, daß ein beträchtlicher Energieanteil der emittierten Strahlung im für das menschliche Auge sichtbaren Wellenlängenbereich abgegeben wird. Sie erscheinen dem Auge hell (daher der Begriff ‚Hellstrahler‘) und je nach Oberflächentemperatur auch farbig. Halogenstrahler werden mit Temperaturen von 2800...3000 K betrieben. Ihre Wendel hat dabei eine hellgelbe bis weiße Färbung. Der Vorschlag ‚Halogen‘ weist auf einen zusätzlich vorhandenen Stoff im Lampenkolben, meist Bromverbindungen zur Verlängerung der Lebensdauer und zur Vermeidung der Kolbenschwärzung, hin.

Der Grundgedanke der Verwendung eines Halogenstrahlers zur MTP-Temperierung ist die Energieabstrahlung in einem Wellenlängenbereich unter dem der Dunkelstrahler, um das spektrale Maximum des Strahlers vom Absorptionsmaximum des Werkstoffes PS zu trennen. Zusätzlich bietet sich an, durch die Wahl von stabförmigen Halogenstrahlern die Homogenität in Richtung der Stablänge durch einen hinreichend langen Strahler zu erreichen. Der entstehende bestrahlte Bereich muß die Dimension der MTP überschreiten. Die Strahlungsleistungsdichte in dieser Ausdehnung muß homogen verteilt sein. Die Homogenität senkrecht zur Stablänge muß durch Bewegung des Strahlers erreicht werden. Die Bewegung des Strahlers muß die andere Dimension der MTP, die in Fahrtrichtung, nur um die lichte Weite des zum Strahler gehörigen Reflektors überschreiten. An die Homogenität der Strahlungsleistungsdichte in Fahrtrichtung müssen keine Forderungen gestellt werden, weil die ins Well eingetragene Leistung dem Integral der Strahlungsleistungsdichte über den Weg in Fahrtrichtung entspricht. Da nicht alle Wells gleichzeitig gleich viel Energie bekommen, steigt gegenüber den flächenhaften Dunkelstrahlern entweder die Aufheizzeit oder die benötigte Strahlungsleistungsdichte in der Ebene der MTP. Es wurden die Eigenschaften der drei in Tabelle 3.8 aufgeführten Halogenstrahler untersucht.

Hellstrahler	strahlende Länge	Wendeldurchmesser	Kolbendurchmesser	ursprüngliche Verwendung	Reflektor
440 W	78 mm	1 mm	9 mm	Beleuchtung	industriell, parabelähnlich
900 W	240 mm	1.1 mm	8 mm	Toner-Fixation ¹⁾	Selbstbau, halbkreisförmig
1000 W	128 mm	1.5 mm	9.5 mm	Beleuchtung	Selbstbau, halbkreisförmig

Tabelle 3.8: Daten der verwendeten Halogenstrahler; Nennspannung bei allen: 220 V, Form bei allen: rotationssymmetrisch.

¹⁾ in Laser-Druckern

Die folgenden Versuche fanden am absorbanzmessenden Reader statt. Zunächst wurde der 440 W-Strahler benutzt. Beim Aufheizen wurde immer geschüttelt. Das Lösungsvolumen betrug 250 µl in Greiner F-MTP. Es wurde kein homogenisierender Aluminiumblock verwendet. Versuchsergebnisse, bei denen eine Homogenität angegeben ist, wurden durch Messung im absorbanzmessenden Reader Typ 1400 erhalten.

Das Erwärmen einer befüllten MTP unter dem 440 W-Strahler ohne Bewegung liefert in Längsrichtung des Strahlers einen Wärmeberg in der Mitte und quer dazu das Leistungsprofil entsprechend dem umgebenden Reflektor. Das führt zu schlechten Homogenitäten von 0.7...1°C. Die Bewegung des Strahlers relativ zur MTP verbessert die Homogenitäten in Bewegungsrichtung, wenn der Fahrweg in die Größenordnung der MTP-Abmessung kommt. Damit in der anderen Richtung ebenfalls eine gute Homogenität zustandekommt, muß der Strahler mit seiner Längsachse parallel zur kleineren MTP-Abmessung, der Spaltenrichtung, ausgerichtet sein und in Richtung der größeren MTP-Abmessung, der Zeilenrichtung, bewegt werden. So durchgeführte Versuche ergaben beim manuellen Verschieben des Strahlers relativ zur MTP Homogenitäten von 1.1...1.6°C über die ganze MTP. Dieser Wert ist zu schlecht. Deshalb wurde das manuelle Verschieben des Strahlers für alle folgenden Versuche grundsätzlich durch ein maschinelles Verschieben mit Hilfe des Pipettierroboters ersetzt. Das Fahren muß einen so großen Weg umfassen, daß die jeweils letzte Well-Reihe der MTP in Fahrtrichtung sicher aus dem Strahlungsbereich herauskommt. Die Fahrgeschwindigkeit des Schlittens beträgt bei allen Versuchen 9.5 cm/s.

Die befüllte Greiner F-MTP aus dem Werkstoff PS zeigt nach 35 s Bestrahlung mit dem 440 W-Strahler im Abstand von 30 mm ohne Bewegung keine Wärmeschäden wie verformte Wells o.ä.. Verschiedene Strahlungsleistungen von 1/1, 1/2, 1/3 und 1/4 von 440 W bei gleichzeitiger Zunahme der Bestrahlungszeit bis zum Erreichen von 37°C Lösungstemperatur führt gleichfalls nicht zu thermischen Schäden an der MTP. Die Temperatur der Oberfläche der MTP erreicht dabei höchstens 78°C, 89°C, 67°C und 72°C.

Die Bestrahlung der leeren MTP führt nicht zur Phosphoreszenz des MTP-Werkstoffs. Abb. 3.13 zeigt den zeitlichen Verlauf der Werkstoffphosphoreszenz nach Bestrahlung. Die Meßwerte liegen vollständig im Bereich des Hintergrundsignals des chemilumineszenzmessenden Readers von bis zu 45 RLU.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Absorption vorrangig durch Aqua dest oder durch die TRIS-Kresolrot-Lösung verursacht wird. Das kann mit Hilfe der Aufheizgeschwindigkeit ermittelt werden. Dazu wurden 250 µl Aqua dest in eine Greiner F-MTP gefüllt und der 440 W-Strahler darüber 12 mal hin- und hergefahren. Nach einer Bestrahlungsdauer von 88 s wurde im Well E7 eine Temperaturerhöhung von 20.06°C festgestellt. Damit beträgt die Erwärmungsgeschwindigkeit für Aqua dest 0.23°C/s. Der gleiche Versuch wurde mit einer TRIS-Kresolrot-Lösung wiederholt. Hier betrug die Temperaturerhöhung 19.36°C und somit

die Erwärmungsgeschwindigkeit 0.22°C/s . Die beiden berechneten Erwärmungsgeschwindigkeiten sind praktisch gleich groß.

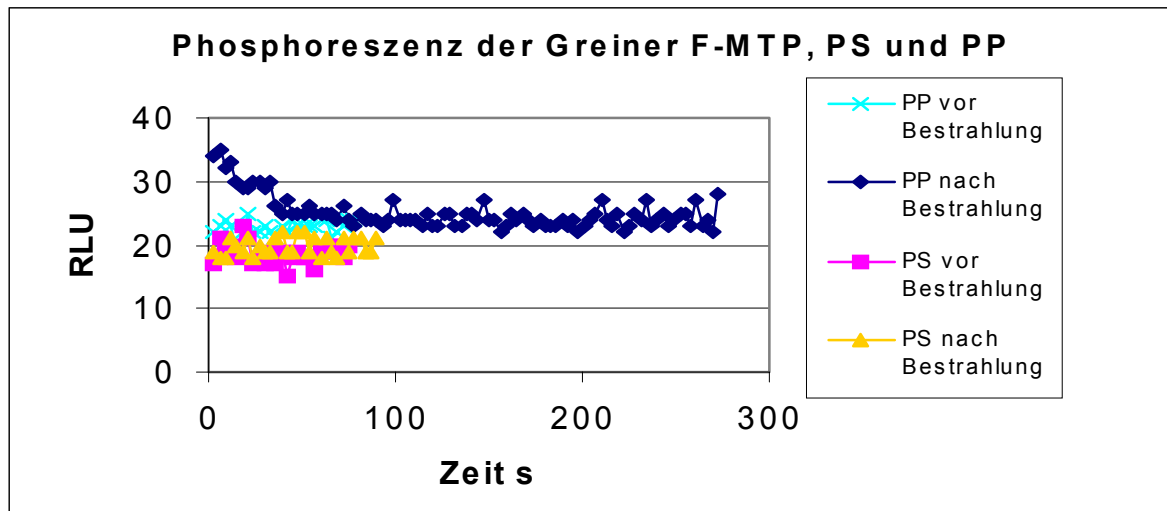


Abb. 3.13: Phosphoreszenz leerer Greiner F-MTP aus den Werkstoffen PS und PP nach 30 s Bestrahlung mit einem 440 W-Halogenstrahler in 25 mm Entfernung vom Reflektor; gemessen mit dem chemilumineszenzmessenden Reader LB96P. Das Ende der Bestrahlung liegt 10 s vor dem Punkt $t=0$ in diesem Diagramm.

Bei der Erwärmung der Lösung durch einen Halogenstrahler kann bei gleichzeitiger Temperaturmessung im Well mit dem Sensor des elektronischen Thermometers DTMS $5...60^{\circ}\text{C}$ beobachtet werden, daß die angezeigte Temperatur sofort nach dem Ausschalten des Strahlers innerhalb von fünf Sekunden um etwa 3°C sinkt. Danach sinkt die Temperatur deutlich langsamer.

Schließlich wurde der Einfluß der Strahlung auf die Aktivität des Enzyms AP untersucht. Es soll herausgefunden werden, ob durch das Vorhandensein einer intensiven Licht- und Wärmequelle die Aktivität abnimmt. Dazu wurde zunächst die Aktivität einer AP-Lösung bei einer Raumtemperatur von 21.5°C in einer Küvette am Uvikon 933 gemessen. Dann wurde die Lösung von der Küvette in drei verschiedene Wells einer Greiner F-MTP umpipettiert. Das Erwärmen der Lösung erfolgte unter dem 440 W-Halogenstrahler für 45 s ohne Fahren und mit Schütteln. Dabei stieg die Lösungstemperatur auf 37.88°C . Danach wurde die Lösung wieder in eine Küvette umpipettiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Wenn die Aktivität des Enzyms nach der beschriebenen Prozedur nicht gesunken ist, hat es durch die Erwärmung keinen Schaden genommen. Tabelle 3.9 zeigt die Aktivitäten des Enzyms AP vor und nach der Erwärmung.

Im nächsten Schritt wurden Untersuchungen zur Erwärmungsgeschwindigkeit und Homogenität bei allen drei zur Verfügung stehenden Hellstrahlern durchgeführt. Dazu wurde Strahler mit Reflektor am horizontal beweglichen Schlitten des Pipettierroboters befestigt. Der Fahrweg wurde so groß gewählt, daß die MTP in den äußeren Positionen nicht von der

Strahlung getroffen wird. In der Mitte des Fahrwegs befindet sich die MTP auf einem Schüttler.

Enzymaktivität	Well a	Well b	Well c
bei 21.5°C vor Erwärmung und Abkühlung	0.5132 U/ml	0.4580 U/ml	0.4611 U/ml
bei 21.5°C nach Erwärmung und Abkühlung	0.4215 U/ml	0.4613 U/ml	0.4538 U/ml

Tabelle 3.9: Auf 1 ml Lösungsvolumen bezogene Aktivität des Enzyms AP bei 21.5°C vor und nach Erwärmung auf 37.88°C und nachfolgender Abkühlung auf 21.5°C; gemessen mit einem Uvikon 933, erwärmt in einer Greiner F-MTP in drei verschiedenen Wells, Daten nach [Poppitz 1999].

Der Reflektor des Strahlers reicht bis auf 1 cm an die Oberkante der MTP heran. Das mehrmalige Hin- und Herfahren wird durch die Bedienoberfläche des Pipettierroboters realisiert. Alle Strahler wurden mit voller Leistung betrieben. Es wurde kein homogenisierender Aluminiumblock eingesetzt. Tabelle 3.10 zeigt die mit diesem Aufbau erreichten Ergebnisse.

Hellstrahler	Bewegung	Homogenität	VK Zyklus 4...2	Bestrahlungszeit	Erwärmungsgeschwindigkeit
440 W	ohne	0.8...1.0°C	2.3...2.7 %	30 s	0.48°C/s
	mit	0.5...0.6°C	1.2...1.4 %	88 s	0.20°C/s
900 W	ohne	1.2...1.5°C	3.4...4.4 %	40 s	0.32°C/s
	mit	1.6...2.1°C	4.2...5.4 %	147 s	0.10°C/s
1000 W	ohne	0.9...1.2°C	2.5...3.3 %	40 s	0.35°C/s
	mit	1.2...1.5°C	3.4...4.2 %	110 s	0.13°C/s

Tabelle 3.10: Homogenität, VK über die ganze MTP, Bestrahlungszeit und Erwärmungsgeschwindigkeit beim Aufheizen von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=8.03 bei 21.4°C in Greiner F-MTP ohne homogenisierenden Aluminiumblock mit verschiedenen Halogenstrahlern ohne Folie ohne randabdeckenden Rahmen

Es fällt auf, daß die Homogenität trotz des Fahrens immer noch schlecht ist. Das liegt in erster Linie an den zu warmen Randwells. Dafür ist die Absorption der MTP-Oberfläche zwischen Randwells und MTP-Seitenwand verantwortlich. Deshalb wurde während des Erwärmens mit dem 1000 W-Strahler ein Rahmen auf die MTP gelegt, der die MTP-Oberfläche zwischen Randwells und MTP-Seitenwand abdeckt. Der zu einem Randwell gehörende MTP-Oberflächenanteil ist gerade so groß wie der eines inneren Wells. Das soll den in der MTP-Oberfläche entstandenen und in die Lösung eingetragenen Wärmeanteil für alle Wells gleichgroß machen. Diese Maßnahme führte zu einer Verbesserung der Homogenität auf 0.5...0.6°C gegenüber 1.2...1.5°C unter sonst gleichen Bedingungen (Tabelle 3.10, Zeile 1000 W mit Bewegung). Abgeleitete Ideen, wie Vermeidung der Wärmeleitung zwischen Rahmen und MTP bzw. Abdeckung des Rahmens führten nicht zur Verbesserung der Homogenität. Die konsequente Fortsetzung dieses Gedankens führt auf die Abdeckung der gesamten MTP-Oberfläche mittels einer abdeckenden Lochmaske mit 96 Löchern. Diese

realisiert den ausschließlichen Strahlungseintritt in die Lösungsoberfläche. Mit Hilfe dieser Lochmaske wurden Homogenitäten von 0.6...0.8°C erreicht.

Um den Wärmeeintrag vom Rand der MTP-Oberfläche in die Randwells zu unterbinden, wurde bei einigen MTP die Oberfläche rund um die Randwells herum aufgefräst. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen sind mit dem 1000 W-Strahler Homogenitäten von 1.2...1.5°C erreicht worden. Zusätzlich wurde die Höhe des Strahlers im Reflektor um 25 mm variiert. Sowohl bei hochgestelltem als auch bei tiefgestelltem Strahler sind jeweils die in Fahrtrichtung ganz vorn und ganz hinten liegenden Wells um etwa 3°C und die parallel zur Fahrtrichtung außenliegenden Wells um etwa 0.6...0.8 °C wärmer als die innenliegenden Wells, was die schlechten Homogenitäten erklärt. Die Schlitze im Rand der MTP-Oberfläche führten nicht zu einer Verbesserung der Homogenität.

Ein anderes Experiment zeigt jedoch, daß der Rand der MTP-Oberfläche trotzdem eine Rolle spielen muß: Läßt man die 36 Randwells unbefüllt, sind die jetzt außen liegenden Wells (Rechteck B2-G11) nach Bestrahlung wärmer als die innenliegenden.

Die nächste Überlegung galt dem Boden unter der MTP. Es ist denkbar, daß Reflexionen an der Oberfläche der Schüttlerplatte zum zweimaligen Strahldurchlauf führen. Das kann nach Abb. D1 für Wellenlängen unter 1.4 µm vorkommen und führt für diese zu einem nochmaligen Wärmeeintrag. Bei ungleichmäßiger Reflexion kann eine zusätzliche Inhomogenität der Temperaturverteilung auftreten. Es wurde versucht, Reflexionen an der Schüttlerplatte durch den Einsatz absorbierender (IR-Sperrfilter) und diffus reflektierender (schwarzer Stoff, Papier verschiedener Farben und Oberflächenstruktur) Materialien zu verhindern. Diese Versuche sind erfolglos verlaufen. Es ließ sich weder mit Bewegung der MTP unter dem 440 W-Strahler die Homogenität deutlich verbessern noch ein bestimmtes Muster der Temperaturverteilung reproduzieren.

Strahler	Bewegung	Homogenität	VK Zyklus 4...2	Bestrahlungszeit	Erwärmungs- geschwindigkeit
440 W	ohne	0.16...0.38°C	0.45...1.03 %	30 s	0.36°C/s
	mit	0.16...0.26°C	0.48...0.75 %	110 s	0.11°C/s
900 W	ohne	0.18...0.32°C	0.51...0.89 %	60 s	0.20°C/s
	mit	0.13...0.22°C	0.37...0.61 %	147 s	0.05°C/s
1000 W	ohne	0.26...0.63°C	0.69...1.66 %	60 s	0.26°C/s
	mit	0.12...0.28°C	0.35...0.80 %	147 s	0.10°C/s

Tabelle 3.11: Homogenität, VK über alle Wells, Bestrahlungszeit und Erwärmungsgeschwindigkeit beim Aufheizen von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.98 bei 21.9°C in Nunc-strips im homogenisierenden Aluminiumblock mit verschiedenen Halogenstrahlern ohne Folie ohne randabdeckenden Rahmen

Da mit den beschriebenen Mitteln die schlechte Homogenität in der Temperaturverteilung nicht wesentlich zu verbessern war, wurde die Verringerung der Wirkung angestrebt. Dazu

dient ein homogenisierender Aluminiumblock, in dessen 96 Löcher Nunc-strips eingepreßt werden. Aufgrund der Wärmeleitung im Aluminium und der großen Mantelfläche der Wells passiert ein Ausgleich verschiedener Lösungstemperaturen von Homogenität 0.36°C auf 0.18°C in 3 min.

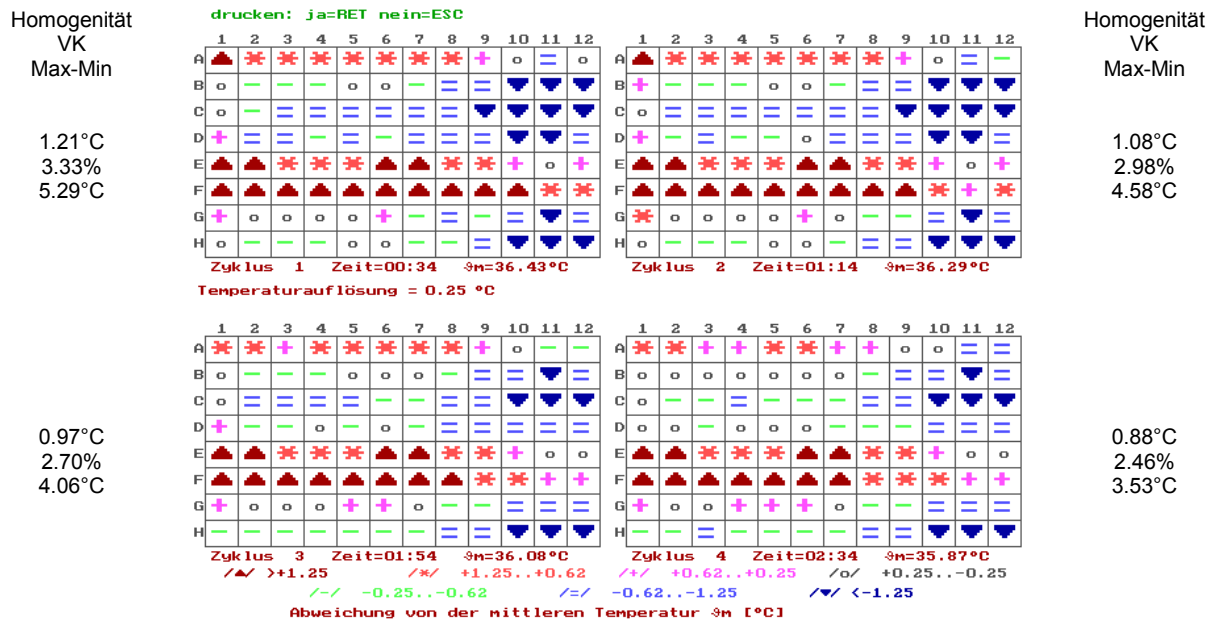


Abb. 3.14: Aufheizung von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=8.03 bei 21.4°C in Greiner F-MTP, mit Schütteln ohne Bewegung, ohne homogenisierenden Aluminiumblock, ohne randabdeckenden Rahmen, Reader auf 40°C vorgeheizt, 1000 W-Strahler

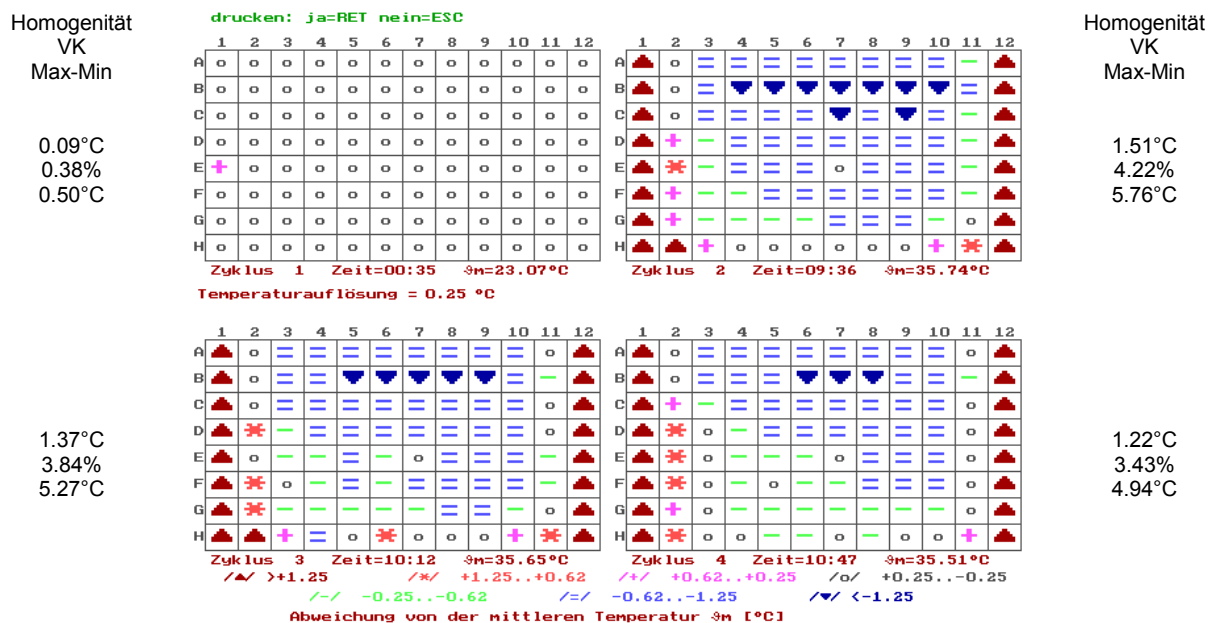


Abb. 3.15: wie Abb. 3.14, jedoch mit Bewegung, Zyklus 1= Ausgangszustand bei Raumtemperatur

In den folgenden Versuchen wurde der beschriebene Aluminiumblock mit Nunc-strips bestückt und in demselben Aufbau wie oben beschrieben eingesetzt. Tabelle 3.11 zeigt die so erreichten Ergebnisse.

Für die weiteren Versuche wurde der 1000 W-Strahler ausgewählt, weil er lt. Tabelle 3.11 gegenüber dem 900 W-Strahler die doppelte Erwärmungsgeschwindigkeit und gegenüber dem 440 W-Strahler eine größere Länge aufweist.

Die Abbildungen 3.14, 3.15, 3.16 und 3.17 zeigen die Temperaturverteilung beim Aufheizen mit einem 1000 W-Halogenstrahler, jeweils mit und ohne Bewegung des Strahlers sowie mit homogenisierendem Aluminiumblock und ohne ihn.

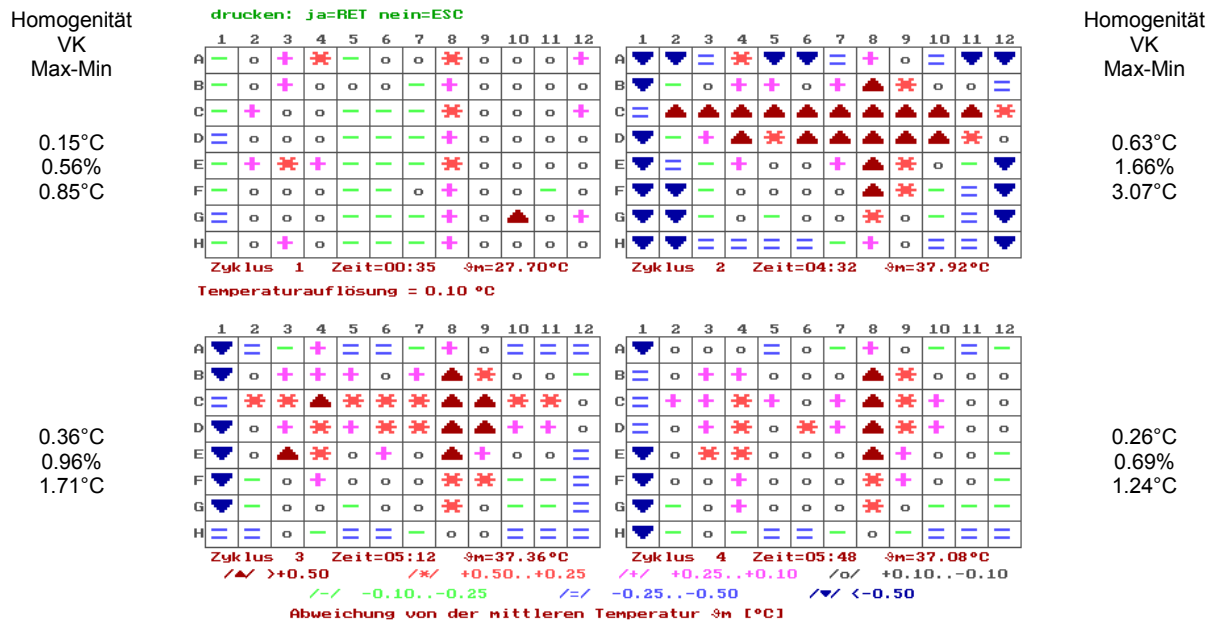


Abb. 3.16: Aufheizung von 250 μl 78 μM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=8.03 bei 21.4°C in Greiner F-MTP, mit Schütteln ohne Bewegung, mit homogenisierendem Aluminiumblock, ohne randabdeckenden Rahmen, Reader auf 40°C vorgeheizt, Zyklus 1= Ausgangszustand bei Raumtemperatur, 1000 W-Strahler

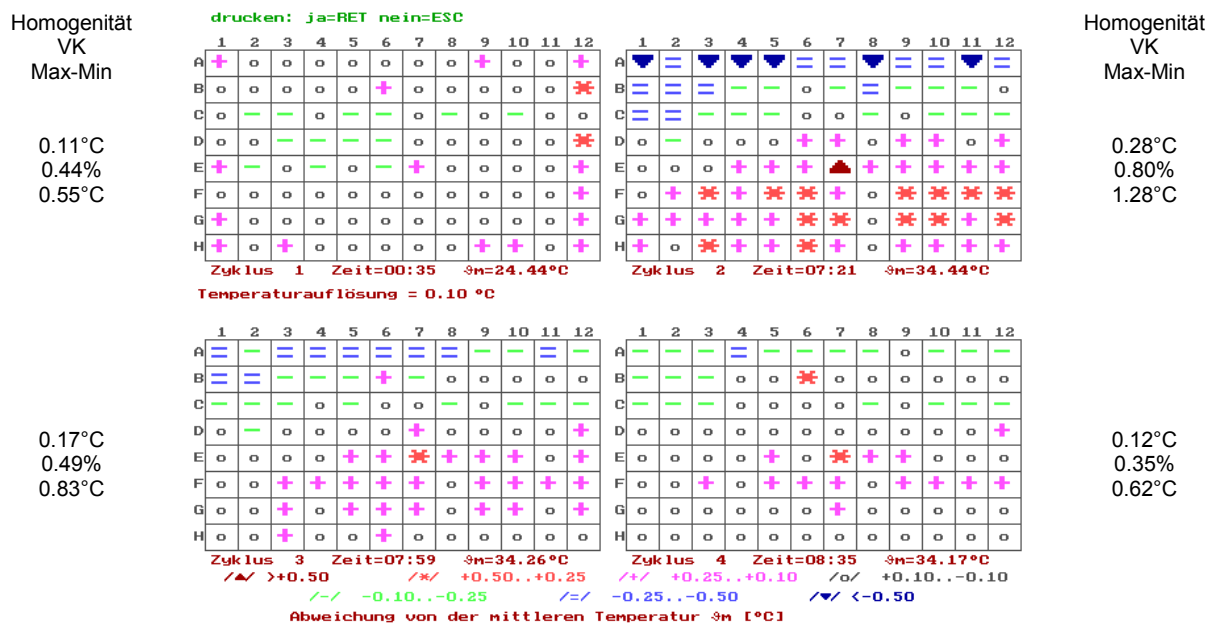


Abb. 3.17: wie Abb. 3.16, jedoch mit Bewegung

Wurde eine befüllte MTP mit einer abdeckenden selbstklebenden Folien versehen, kann kein Schmutz in die Lösung gelangen, und die Verdunstung wird gestoppt. Dafür werden vorrangig Folien vom Typ Falcon 3073 aus Polyester mit einer Dicke von 25.4 μm verwendet. Um den Einfluß der Folie beim Aufheizen auf die Homogenität und die Erwärmungsgeschwindigkeit festzustellen, wurde beim Aufheizen unter dem 1000 W-Strahler eine derartige Folie auf die Nunc-strips im Aluminiumblock aufgeklebt. Das Ermitteln der Meßwerte zum Berechnen der Temperaturen in den Wells erfolgte ohne Folie. Unter sonst gleichen Bedingungen wie für Tabelle 3.11 angegeben wurde mit Bewegung des Strahlers eine Homogenität von 0.27°C und eine Erwärmungsgeschwindigkeit von 0.065°C/s ermittelt.

Außer im für die Erwärmung genutzten Wellenlängenbereich oberhalb 1.3 μm sendet der Hellstrahler darunter einen beträchtlichen Anteil seiner Energie aus. Dieser Anteil ist für die direkte Erwärmung nicht wirksam, weil er vom Wasser nicht absorbiert wird. Eine Berechnung der Absorption im Werkstoff der MTP ergibt sowohl für PS als auch für PP im Wellenlängenbereich 0.1...20 μm eine Leistungsdichte von 2.4 mW/mm². Dabei wurden für PS und PP die Transmissionsspektren aus Abb. 3.12 und statt einem Dunkelstrahler ein Halogenstrahler mit 2850 K und Quarzglasgehäuse zugrunde gelegt.

Der sichtbare Strahlungsanteil könnte einen Einfluß auf das Analysengut haben. Deshalb wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diesen von der Lösung fernzuhalten. Es wurden zwei Möglichkeiten gefunden:

Die erste besteht darin, einen Langpaßfilter RG 830 zu verwenden: Seine Transmission liegt für $\lambda=725\text{ nm}$ bei 10^{-5} , für $\lambda=830\text{ nm}$ bei 0.5 und steigt dann weiter mit der Wellenlänge [o.V. Katalog Optische Glasfilter]. Der sichtbare Strahlungsanteil wird absorbiert, der IR-Anteil wird hindurchgelassen. Das Analysengut wird außer mit dem Wärmeanteil nur mit einem sehr schwachen dunkelroten Licht beaufschlagt.

Die zweite Möglichkeit ist ein sog. Kaltlichtspiegel. Er trennt den sichtbaren Strahlungsanteil vom IR-Anteil. Die durchschnittliche Reflexion des sichtbaren Anteils ist im Bereich 450 nm bis 650 nm $\geq 90\%$, die durchschnittliche Transmission im Bereich 800 nm bis 1200 nm $\geq 85\%$. Dabei muß die Strahlung mit einem Winkel von 45° einfallen [o.V. Optical Filter Guide S. 30f.]. Abweichungen vom Einfallswinkel bewirken veränderte Reflexions- und Transmissionsverhältnisse. Der Kaltlichtspiegel absorbiert keinen Energieanteil völlig. Er teilt sie in verschiedene Richtungen auf. Das Analysengut wird außer mit dem Wärmeanteil noch mit einem sichtbaren Anteil beaufschlagt. Dessen Intensität ist entsprechend den angegebenen Transmissionen höher als beim Langpaßfilter.

Tabelle 3.12 zeigt die mit diesen beiden Filtergläsern erreichten Erwärmungsgeschwindigkeiten mit Bewegung des Strahlers, die Lichttransmission und Temperaturen an der Ober- und Unterseite des Langpaßfilters RG 830 und des Kaltlichtspiegels.

	Erwärmungs- geschwindigkeit	Lichttransmission	Temperatur der Oberseite	Temperatur der Unterseite
RG 830	0.054°C/s	0.0015	155°C	114°C
Kaltlichtspiegel	0.037°C/s	0.2	158°C	108°C

Tabelle 3.12: Erwärmungsgeschwindigkeit von 250 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.98 bei 21.9°C in Nunc-strips im homogenisierenden Aluminiumblock mit bewegtem 1000 W-Halogenstrahler bei Anwesenheit von Filtergläsern, Lichttransmission (Verhältnis der Photoströme einer Photodiode SP 103 im Kurzschlußbetrieb in der Ebene der MTP mit und ohne Filterglas sowie die nach 150 s Bestrahlungszeit entstehenden Temperaturen an den Filtergläsern; Die Photodiode SP 103 wurde wegen ihrer Empfindlichkeit im nahen IR hinter einem Tageslichtfilter betrieben.

Obwohl Halogenstrahler vorwiegend für Beleuchtungszwecke entwickelt und eingesetzt werden, gestattet ihr beträchtlicher Leistungsanteil im IR-Bereich auch eine Anwendung als Wärmequelle. Das ausgesendete Licht hat für die Erwärmung der Lösung im Well keine weitere Bedeutung, da es vom Wasser nicht absorbiert wird.

Das Erwärmen einer befüllten Greiner F-MTP unter dem 440 W-Strahler ohne Bewegung liefert ein Abbild der Leistungsverteilung: unterhalb der Reflektor-Scheitellinie befindet sich ein Leistungsmaximum. Das ist anschaulich richtig, denn der parabelähnliche Reflektor erzeugt nur einen parallelen Strahlengang, nicht jedoch eine homogene Leistungsverteilung. In Längsrichtung des Strahlers sollte die Homogenität durch die Strahlerlänge gewährleistet werden, was nicht eintrat. Insgesamt ist die mit manuellem Verschieben des Strahlers erreichte Homogenität von 1.1...1.6°C deutlich schlechter als die geforderten 0.1°C.

Aus der Inhomogenität in Querrichtung folgt, daß eine Relativbewegung zwischen Strahler und MTP unvermeidlich ist. Aus der Inhomogenität in Längsrichtung folgt, daß die Strahlerlänge viel größer sein muß als die in dieser Richtung liegende MTP-Abmessung. Es muß also ein längerer Strahler verwendet werden, der maschinell verfahren wird. Der Fahrweg muß hinreichend groß sein, um zu garantieren, daß jede Wellreihe die gleiche Energie bekommt. Unter diesem Aspekt ist die genaue Form des Reflektors, also die Leistungsverteilung in Fahrtrichtung, nicht mehr wichtig. Die Leistungsverteilung muß nur zeitlich konstant sein. Der Reflektor dient lediglich dem Sammeln der von der Halogenlampe nach allen Richtungen gleichmäßig abgestrahlten Leistung. Diese grundsätzlichen Aussagen führten zum ausschließlich maschinellen Verfahren des Strahlers. Auf eine symmetrische Anordnung des Strahlers relativ zum Reflektor und des Reflektors relativ zur MTP sowie auf permanentes Schütteln der Lösung während des Aufheizens wurde Wert gelegt.

Im Gegensatz zur Erwärmung der Lösung mit Dunkelstrahlern führt die Erwärmung mit Hellstrahlern nicht zu verformten Welloberkanten und ähnlichen Wärmeschäden. Die MTP bleiben stabil, kälter und optisch rein. Dieser Effekt läßt sich mit Hilfe der spektralen Leistungsverteilung des Halogenstrahlers erklären. Wird das Wiensche Verschiebungsgesetz auf die Temperatur der Wendel des Halogenstrahlers von ≈ 3000 K angewendet, so

erhält man die Wellenlänge der maximalen spektralen spezifischen Ausstrahlung des Halogenstrahlers:

$$\lambda_{\text{M}\lambda\text{s,max}} = 2897.8 \text{ K}\cdot\mu\text{m}/3000 \text{ K} \approx 1 \mu\text{m} \quad (3.8).$$

Der Wellenlängenbereich, in dem PS am meisten absorbiert, liegt bei 3...5 μm , also weit auf der fallenden Flanke der spektralen spezifischen Ausstrahlung eines schwarzen Strahlers mit 3000 K. Dort ist die Leistungsdichte im Vergleich zum Maximum klein. Der Halogenstrahler mit dieser Temperatur strahlt im Bereich 0...1.4 μm etwa 64 %, im Bereich 1.4...3.5 μm etwa 31 % und im Bereich oberhalb 3.5 μm etwa 5 % seiner Leistung aus. Zusätzlich und verbessernd kommt hinzu, daß die Transmission des Lampenkolbens aus Quarzglas bei einer Wellenlänge von 3.5 μm stark sinkt und darüber niedrig bleibt [o.V. Oriel-Katalog S.75]. D.h., genau dort, wo PS absorbiert, wird die ohnehin schon geringe Leistungsdichte des Hellstrahlers durch den Quarzglaskolben nochmals verringert. Die Leistungsdichte der IR-Strahlung, die direkt in der MTP Wärme erzeugt, reicht nicht mehr aus, thermische Schäden an ihr hervorzurufen. Dieser Gedankengang wird gestützt durch die Tatsache, daß beim Dunkelstrahler die Erhöhung der eingespeisten Leistung, also seiner Oberflächentemperatur, zu einer Verringerung der thermischen Schäden an der MTP führt. Tatsächlich ist die berechnete Leistungsdichte im Vergleich zum Dunkelstrahler III in beiden MTP-Werkstoffen deutlich niedriger: 2.4/7.2 \approx 33% für PS und 2.4/6.1 \approx 39% für PP. Es bleibt, die Erwärmung des Lampenkolbens auf Abstrahlung in dem für PS kritischen Bereich zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Emissionsspektren des Halogenstrahlers bei verschiedenen Leistungen an einem Spektrometer IFS 66 gemessen. Das Meßergebnis muß die Summe aus der Temperaturstrahlung der Wendel multipliziert mit dem Transmissionsspektrum des Strahlerkolbens und der Temperaturstrahlung des Strahlerkolbens sein. Im gemessenen Spektrum konnte zwischen 1.67 μm und 10 μm kein zusätzliches Maximum gefunden werden, also wirkt der Strahlerkolben nicht als Dunkelstrahler.

Die Verwendung eines Halogenstrahlers für das Aufheizen hat eine längere Bestrahlung der MTP mit hellem Licht zur Folge. Sie könnten phosphoreszieren. Dieser Effekt wurde für PS- und PP-MTP in Abb. 3.13 dargestellt. PS-MTP zeigen überhaupt keine Reaktion auf die Bestrahlung und PP-MTP nur eine schwache. Selbst die gedachte Verlängerung der Kurve ‚PP nach Bestrahlung‘ von $t=0$ bis zum Zeitpunkt $t=-10$ s, dem Ende der Bestrahlung, ergibt lediglich ein Meßsignal im Bereich des Hintergrundsignals des chemilumineszenzmessenden Readers. Eine Greiner F-MTP aus PS erhöht das Hintergrundsignal also überhaupt nicht, und eine aus PP verdoppelt es etwa. Es liegt dann aber immer noch innerhalb des unabhängig davon vorhandenen Hintergrundsignals von bis zu 45 RLU. Wenn also bei dem sehr empfindlichen chemilumineszenzmessenden Reader nur eine geringfügige Erhöhung des Hintergrundsignals zu verzeichnen ist, dann ist die Verwendung solcherart bestrahlter MTP in einem weniger empfindlichen absorbanzmessenden Reader ohne weiteres möglich.

Zur Untersuchung des Erwärmungsmechanismus wurde die Aufheizgeschwindigkeit von Aqua dest und einer TRIS-Kresolrot-Lösung unter sonst gleichen Bedingungen verglichen. Da sie praktisch gleich groß sind, spielt für die Aufheizgeschwindigkeit nur die Absorption des Wassers eine maßgebliche Rolle, nicht aber die Absorption der im Wasser gelösten Stoffe. Damit ist der grundsätzliche Erwärmungsmechanismus beim Hellstrahler der gleiche wie beim Dunkelstrahler. Die im Aqua dest zu erwärmenden Stoffe sind wählbar. Sie beeinflussen die Aufheizgeschwindigkeit nicht, weil schon das Aqua dest sämtliche Strahlungsleistung absorbiert.

Das schnelle Steigen der vom DTMS 5...60°C angezeigten Temperaturen bei eingeschaltetem Strahler bzw. das schnelle Sinken nach seinem Ausschalten ist auf den Erwärmungsmechanismus zurückzuführen. Aqua dest absorbiert nur Leistungsanteile oberhalb von 1.4 μm , der nichttransparente Sensor und seine Zuleitungen jedoch noch den Leistungsanteil darunter, also gerade den mit 64% größten Anteil der Gesamtleistung. Der Sensor wird folglich wärmer als seine Umgebung und bleibt es, solange der Halogenstrahler eingeschaltet ist. Es findet kein Temperatúrausgleich mit der Lösung statt. Erst nach Ausschalten des Halogenstrahlers gleicht sich die Sensortemperatur der Lösungstemperatur an. Bei Erwärmung mit einem Halogenstrahler ist ein solcher Sensor zur Überwachung der Lösungstemperatur also nur bedingt geeignet. Die später folgende langsame Abnahme der Lösungstemperatur ist auf Wärmeabgabe zur Well-Umgebung zurückzuführen.

Die nächste Frage ist die nach der Schädigung des Analysengutes durch die Strahlung des Halogenstrahlers. Die AP-Lösung in drei gleich befüllten Wells zeigt in Well b und c (Tabelle 3.9) sowohl vor und nach der Erwärmung und Abkühlung als auch untereinander sehr nah beieinander liegende Aktivitäten an. Davon weicht das Meßergebnis des Wells a ab. Es zeigt vor der Erwärmung eine höhere und nach der Erwärmung eine niedrigere Aktivität im Vergleich zu Well b und c. Da alle drei Wells mit der gleichen AP-Lösung befüllt wurden, hätten sehr ähnliche Ergebnisse herauskommen müssen. Aus dem Ergebnis läßt sich schlußfolgern, daß die Aktivität des Enzyms AP bei Erwärmung mit einem Halogenstrahler nicht wesentlich beeinflusst wird. Die Aussage ist aufgrund der geringen Anzahl der beobachteten Wells statistisch nicht gesichert.

In Tabelle 3.10 wurden die erreichten Homogenitäten, VK und Erwärmungsgeschwindigkeiten aller drei vorhandenen Halogenstrahler gegenübergestellt, jeweils mit und ohne Bewegung der MTP während des Aufheizens und jeweils ohne homogenisierenden Aluminiumblock. Die Bestrahlungszeit wurde so gewählt, daß ausgehend von der Raumtemperatur etwa 37...40°C erreicht wurden. Der schlechtere Wert der angegebenen Homogenität ist der sofort nach Beendigung des Aufheizens gemessene (Zyklus 2), der bessere wurde jeweils etwa 75 s später (Zyklus 4) gemessen. Die Erwärmungsgeschwindigkeit ergibt sich aus der Differenz der Temperaturmittelwerte über die MTP nach und vor der Bestrahlung dividiert

durch die Bestrahlungszeit. Letztere muß zum Erreichen der gleichen Temperaturdifferenz mit Bewegung des Strahlers größer sein als ohne, weil es für jedes Well Zeitbereiche gibt, in denen es nicht bestrahlt wird. Die Erwärmungsgeschwindigkeit ist entsprechend kleiner. Es wurde erwartet, daß sich aufgrund der Bewegung des Strahlers relativ zur MTP die Homogenität verbessert. Dieser Fall trat nur beim 440 W-Strahler ein. Beim 900 W- und 1000 W-Strahler ist die Homogenität mit Bewegung der MTP schlechter als ohne Bewegung. Die Ursache der schlechten Homogenität ist in der verstärkten Erwärmung von Randzeilen und -spalten zu suchen. Die Homogenität sollte in Fahrtrichtung des Strahlers sehr gut sein, weil erwartet wird, daß unabhängig von der Leistungsverteilung des Strahlers in Fahrtrichtung alle in Fahrtrichtung hintereinanderliegenden Wells die gleiche Energie bekommen. Die beiden Strahler, bei denen sich diese Erwartung nicht erfüllte, sind genau diejenigen, welche einen Reflektor mit halbkreisförmigem Querschnitt besitzen. Im Kreismittelpunkt sitzt der Strahler. Die Reflektoroberfläche ist blankpoliert und glatt. Der Reflektor besteht aus 0.75 mm starkem Edelstahl. Dagegen besitzt der 440 W-Strahler einen parabolischen Reflektor. In dessen Brennpunkt sitzt der Strahler. Die Oberfläche des Reflektors ist stumpf. Er besteht aus 0.25 mm starkem Aluminium. Zusätzlich wurden herstellerseitig in den Reflektor Noppen mit einem Durchmesser von 5 mm zur mechanischen Stabilisierung eingepreßt, die die Glattheit der Oberfläche verschlechtern. Trotzdem liefert nur dieser Strahler eine mit Bewegung bessere Homogenität als ohne. Unter der Voraussetzung, daß Reflektorwerkstoff und Oberflächenrauigkeit die Homogenität nicht beeinflussen, kann nur noch die Form des Reflektors beeinflussend sein. Gerade sie sollte aber wegen der Bewegung des Strahlers während des Aufheizens keinen Einfluß haben. Im Gegensatz zur einführenden Annahme, eine Bewegung des Strahlers relativ zur MTP während des Aufheizens läßt die Leistungsverteilung in Fahrtrichtung bedeutungslos werden, ergibt sich als Ergebnis, daß für die beste Homogenität ohne homogenisierenden Aluminiumblock sowohl das Bewegen als auch ein parabelförmiger Reflektor notwendig sind.

Ein beträchtlicher Anteil der schlechten Homogenität ist auf zu warme Randwells zurückzuführen. Eine Abdeckung des MTP-Randes mit einem Aluminiumrahmen soll zur Vermeidung von Strahlungsabsorption in diesem Bereich führen. Die Randwells erhalten keine zusätzliche Energie aus dem MTP-Rand, sollten also nicht mehr wärmer werden als die innenliegenden Wells. Diese Erwartung erfüllte sich nur teilweise. Die Homogenität wird zwar besser, läßt sich jedoch nicht unter Werte von $0.5...0.6^{\circ}\text{C}$ senken. An diesem Ergebnis sind besonders die in Fahrtrichtung außen liegenden Spalten beteiligt. Sie werden um bis zu 1°C wärmer als die innenliegenden Wells. Das grundsätzliche Problem der Absorption im MTP-Rand ist nicht beseitigt, sondern nur abgeschwächt worden. Es muß ein weiterer Wirkungsmechanismus existieren, der die in Fahrtrichtung außenliegenden Spalten wärmer werden läßt. Eine versuchsshalber auf die MTP aufgesetzte abdeckende Lochmaske mit 96 Löchern

im Wellraster zur Vermeidung jeglicher Strahlungsabsorption in der MTP-Oberfläche führt gleichfalls zur verstärkten Erwärmung der in Fahrtrichtung außen liegenden Spalten. Die so erreichte Homogenität liegt bei $0.6...0.8^{\circ}\text{C}$. Die aufgesetzte Lochmaske verschlechtert also die Homogenität im Vergleich zum randabdeckenden Aluminiumrahmen.

Da es nicht gelang, die überdurchschnittliche Erwärmung des MTP-Randes zu vermeiden, wurde die Wärmeleitung zwischen MTP-Rand und Randwells mittels Fräsung eines Schlitzes rund um die Randwells unterbunden. Gegenüber der Lösungserwärmung in einer nicht solcherart bearbeiteten MTP konnte keine Verbesserung der Homogenität festgestellt werden. Also spielt die Wärmeleitung vom MTP-Rand in die Randwells offenbar nicht die entscheidende Rolle bzgl. des Effektes zu warmer Randwells. Es muß noch ein anderer Mechanismus wirken. Dies wird durch das Ergebnis des Aufheizexperiments mit leeren Randwells unterstützt: Die jetzt außenliegenden befüllten Wells, also die der zweitäußersten Reihe, sind stärker erwärmt worden als die noch weiter innenliegenden, jedoch ist der Unterschied geringer als der vorher gemessene Unterschied zwischen äußerster und zweitäußerster Reihe. Ein alleiniges Verursachen dieses Effektes durch die MTP konnte durch Drehung der MTP um 90° vor der Bestrahlung ausgeschlossen werden. Andererseits kann die Leistungsverteilung quer zur Fahrtrichtung auch nicht allein beteiligt sein, da der Strahler in dieser Richtung eine große Ausdehnung hat. Es bleibt als Erklärung für die zu warmen Randwells deren im Gegensatz zu den inneren Wells zusätzliche seitliche Bestrahlung durch den bewegten Halogenstrahler. Dafür spricht, daß der Werkstoff PS oberhalb von $1.4\text{ }\mu\text{m}$ noch eine starke Transmission aufweist (Abb. 3.12). Dagegen spricht, daß ein daraufhin durchgeführter Versuch mit einem sehr großen randabdeckenden Rahmen, der also die MTP soweit überragt, daß keine Strahlung von der Seite an die äußeren Wells gelangen kann, keine Homogenitätsverbesserung erbrachte. Auch die Absorption der Luft unter der MTP-Oberfläche kann keine Rolle spielen: Ein 10 mm hohes Luftvolumen absorbiert zwischen 0 und $100\text{ }\mu\text{m}$ von einem 1000 W -Halogenstrahler in 120 mm Abstand unter Berücksichtigung der Transmission von PS nur $0.093\text{ }\mu\text{W/mm}^2$, ein 7.3 mm hohes Wasservolumen dagegen 19.3 mW/mm^2 .

Zur Verringerung zufällig verschiedener Energieeinträge in ein Well durch lokal unterschiedliche Reflexion auf der Oberfläche der Schüttlerplatte nach dem erstmaligen Strahldurchlauf wurde jegliche Reflexion unterbunden. In der Folge ergab sich keine wesentliche Verbesserung der Homogenität. Die Nichtreproduzierbarkeit einer Temperaturverteilung deutet auf andere zufällige Fehler hin. Etwaige Reflexionen unter der MTP können keinen starken Einfluß auf die Temperaturverteilung haben.

Alle bisher versuchten Mittel zur Verbesserung der Homogenität haben keinen zufriedenstellenden Erfolg gebracht. Deshalb wurde versucht, unabhängig von allen Ursachen der Inhomogenität eine Homogenität zu erzwingen, indem unterschiedliche Welltemperaturen

durch einen homogenisierenden Aluminiumblock ausgeglichen werden. Dieser Aluminiumblock ist nur für einen einzigen Wellquerschnitt brauchbar, im vorliegenden Fall für Nuncstrips. Die Ergebnisse der so durchgeführten Aufheizversuche sind in Tabelle 3.11 dargestellt. Ihre Daten sind genau auf die gleiche Art und Weise entstanden wie die aus Tabelle 3.10 mit dem einzigen Unterschied der Verwendung des homogenisierenden Aluminiumblocks. Da dieser mit erwärmt werden muß, wächst die Bestrahlungszeit entsprechend. Wenn dann noch der Strahler relativ zur MTP bewegt wird, ist die benötigte Bestrahlungszeit bereits größer als 2 min. Erwartungsgemäß ist die Homogenität besser geworden. Bereits sofort nach dem Ende des Aufheizens ist die Homogenität deutlich besser als ohne Aluminiumblock, d.h., die Homogenisierung durch Wärmeleitung wirkt schon während des Aufheizens, und die Temperaturunterschiede von Well zu Well werden nicht annähernd so groß wie ohne Aluminiumblock. Bemerkenswert ist der bereits früher erwartete, aber erst jetzt bei allen drei Strahlern auftretende Effekt, daß die Homogenität mit Bewegung besser ist als ohne. Während ohne Aluminiumblock die Bewegung eines Strahlers mit parabelförmigem Reflektorquerschnitt relativ zur MTP für beste Homogenität erforderlich war, kann mit Aluminiumblock offenbar auf den parabelförmigen Querschnitt verzichtet werden. Der Aluminiumblock gleicht einen unerwünschten Effekt der halbkreisförmigen Reflektoren aus. Abb. 3.16 und 3.17 zeigen für den 1000 W-Strahler den stark verbessernden Einfluß des homogenisierenden Aluminiumblocks auf die Homogenität. Der Vorteil des Aluminiumblocks besteht in der Homogenisierung der Temperaturverteilung unabhängig von den Ursachen der Inhomogenität. Er wirkt wie ein Regelkreis, der eine Störung ausregelt.

Falls zum Vermeiden von Verschmutzung oder Verdunstung des Wellinhaltes eine Folie auf die MTP aufgeklebt ist, kann die Erwärmung auch mit dieser aufgeklebten Folie durchgeführt werden. Es wird allerdings ein Teil der Strahlungsleistung absorbiert, woraus eine niedrigere Erwärmungsgeschwindigkeit resultiert. Sie ist unter den notwendigen Bedingungen Aluminiumblock und Strahlerbewegung für eine gute Homogenität mit 0.065°C/s bereits so klein, daß die geforderte Aufheizzeit von 2 min nicht mehr erreichbar ist. Die ermittelte Homogenität ist so groß wie beim Aufheizen ohne Folie unter sonst gleichen Bedingungen, d.h., die Folie absorbiert die Strahlungsleistung unabhängig vom Ort gleichmäßig.

Nach Gleichung (3.8) gibt der Halogenstrahler den größten Teil seiner Energie im Bereich um $1\text{ }\mu\text{m}$ ab. Genau dieser Bereich ist aber für die Lösungserwärmung mit Halogenstrahlern aufgrund deren Temperatur wirkungslos. Es liegt deshalb nahe, den starken Energieanteil von den möglicherweise empfindlichen Lösungen fernzuhalten. Dazu wurden zwei verschiedene optische Filter mit wellenlängenabhängiger Transmission benutzt. Sie sollen wenigstens den sichtbaren Teil von der Lösung fernhalten. Das passiert durch Absorption im RG 830 bzw. durch Reflexion am Kaltlichtspiegel. Die Richtigkeit dieser Überlegung konnte bestätigt werden. Tatsächlich wird das sichtbare Licht stark gedämpft (Tabelle 3.12, Spalte

Lichttransmission) und somit von der Lösung größtenteils ferngehalten. Man muß in Kauf nehmen, daß die Erwärmungsgeschwindigkeit der Lösung bei Einsatz optischer Filter unter sonst gleichen Bedingungen sinkt (Tabelle 3.12, Zeile RG 830 im Vgl. zu Tabelle 3.11, Zeile 1000 W-Strahler mit Bewegung). Dafür gibt es mehrere Ursachen: die Absorption des Filterglases im für die Erwärmung wichtigen Wellenlängenbereich $>1.4 \mu\text{m}$, die Reflexion an der Oberseite des Filterglases und die höhere Absorption schräg einfallender Strahlung. Die Erwärmungsgeschwindigkeit der Lösung beträgt ohne Filterglas 0.1°C/s und reicht bereits nicht mehr, um in 2 min von Umgebungstemperatur auf 37°C zu kommen. Der Einsatz des optischen Filters reduziert sie nochmals und verlängert damit die benötigte Aufheizzeit auf fast das Doppelte. Die Aufheizzeit könnte man zwar durch Einsatz höherer Strahlungsleistung wieder verringern, jedoch wird bereits bei einem einzelnen 1000 W-Strahler der optische Filter sehr heiß (s. Tabelle 3.12). Zusätzlich existiert ein Temperaturgradient in ihm. Die optischen Filter besitzen eine obere Arbeitstemperatur: Der Kaltlichtspiegel darf höchstens 200°C warm werden [o.V. Optical Filter Guide, S.30], der RG 830 höchstens 259°C [o.V. Katalog Optische Glasfilter]. Von dieser Seite her verbietet sich der Einsatz einer viel höheren Strahlungsleistung.

Abschließend ist festzustellen, daß die Lösungserwärmung mit Halogenstrahlern nicht alle Punkte der Aufgabenstellung erfüllt. Zum Erreichen einer guten Homogenität ist es nötig, sowohl einen Aluminiumblock zum Temperatenausgleich einzusetzen als auch den Strahler relativ zur MTP zu bewegen. Dabei liegt die für die Lösungserwärmung von Umgebungstemperatur auf 37°C erforderliche Bestrahlungszeit bei 2...2.5 min. Der Aluminiumblock besitzt Durchgangslöcher zur Aufnahme der Nunc-strips, ist also für Absorbanzmessungen geeignet. Da die Durchgangslöcher formschlüssig zu den Wells passen müssen, kann nur ein bestimmter Wellquerschnitt eingesetzt werden. Damit ist der Einsatz verschiedener Typen von MTP nicht möglich. Eine auf die MTP aufgeklebte Folie verringert bei Einsatz des 1000 W-Strahlers die Aufheizgeschwindigkeit von 0.1 auf 0.065°C/s . Es wächst die benötigte Aufheizzeit. Eine Schädigung des Analysengutes durch die Art der Erwärmung kann ausgeschlossen werden: Optische Filter können den nicht notwendigen Strahlungsanteil des sichtbaren Lichtes von der Lösung fernhalten, und das Analysengut schädigende Temperaturen werden wegen der ständig wirkenden Homogenisierung durch den Aluminiumblock vermieden. Gleichzeitiges Messen und Aufheizen ist nicht möglich, da die Erwärmung den Strahlengang der Messung benötigt und diese wegen gleicher beteiligter Wellenlängen auch stört. Vorstellbar ist wechselweises Aufheizen und Messen sowie die Temperierung des homogenisierenden Aluminiumblocks vor der Bestrahlung auf die Endtemperatur. Dafür wird zusätzlicher Platz benötigt. Ein Halogenstrahler mit 20 cm Baulänge, sein Reflektor und die Mechanik für die Bewegung zwischen MTP und Strahler sowie ein Schüttler lassen das Readervolumen deutlich anwachsen. Vorteilhaft ist das praktisch sofortige Vorhandensein

der Strahlungsenergie nach dem Einschalten des Strahlers. Es gibt im Hellstrahler keine zu erwärmenden thermischen Massen. Die technische Lösung Halogenstrahler zur Erwärmung der Wellinhalte erfordert keine ausgesprochen teuren Komponenten zu ihrer Realisierung. Der vorgegebene Preisrahmen von 3...4 TDM kann voraussichtlich gehalten werden.

Weitere Hellstrahler sind IR-Lampen für medizinische Behandlungen. Sie haben einen Glühfaden, der z.B. von der Netzspannung erhitzt wird. Die Nennleistung beträgt 250 W. Zur besseren Strahlungsausbeute besitzen sie einen kegelförmigen Reflektor mit einem größten Durchmesser von 120 mm. Zum Strahlungsaustritt dient rot eingefärbtes Glas. Mit einer solchen Lampe wurde in 8.6 cm Entfernung eine Homogenität von 3...4°C bei 70 s Heizzeit gemessen. Dabei stieg die Temperatur im Referenzwell von 22.4°C auf 37.3°C. In der Mitte der MTP ist ein Wärmeberg zu erkennen. Der Glühfaden der Lampe bildet sich als verwaschener Wärmeberg rund um die Mitte der MTP ab. Die benötigte Aufheizzeit hängt von der Entfernung ab. Demzufolge ist das austretende Strahlenbündel nicht parallel.

Aufgrund der in keiner Dimension vorhandenen Symmetrie solcher IR-Lampen wurden sie nicht weiter untersucht.

3.3. Dielektrische Erwärmung

3.3.1. Einfluß der Mikrowellen auf die Enzymaktivität

Die Frage des Einflusses von Mikrowellen auf die Enzymaktivität ist in der Literatur bereits mehrfach diskutiert worden:

- Es ist anzunehmen, daß bei Leistungsdichten deutlich über 10 mW/cm^2 Wasserstoffbindungen gelöst werden, die eine nichtthermische Denaturierung verursachen [Röhl 1975]. Diese Leistungsdichte wird im Hohlleiter der für Homogenitätsuntersuchungen verwendeten Mikrowelle (b) stark überschritten: Der Mittelwert über die Hohlleiterquerschnittsfläche beträgt $700 \text{ W}/32 \text{ cm}^2 = 21.9 \text{ W/cm}^2$.
- Die Aktivität der beiden Enzyme Plasmalipase und Amylase nimmt nach erstmaliger Mikrowellenbestrahlung ab. Darauf folgende Bestrahlungen mit sowohl verschieden langer Bestrahlungszeit bei konstanter Leistung als auch mit gleich langer Bestrahlungszeit bei verschiedener Leistung lassen die Enzymaktivität nicht weiter abnehmen. Dabei wird die Enzymtemperatur auf 37°C gehalten [Sacchitelli u.a. 1956].
- Saure Phosphatase und unspezifische Esterase sind bei 70°C sichtlich weniger aktiv als bei 60°C [Hopwood u.a. 1984, zitiert nach Boon u.a. 1989 S.78]. Eine Entscheidung, ob der Effekt rein thermisch oder auch durch Mikrowellen verursacht wird, wurde nicht getroffen.

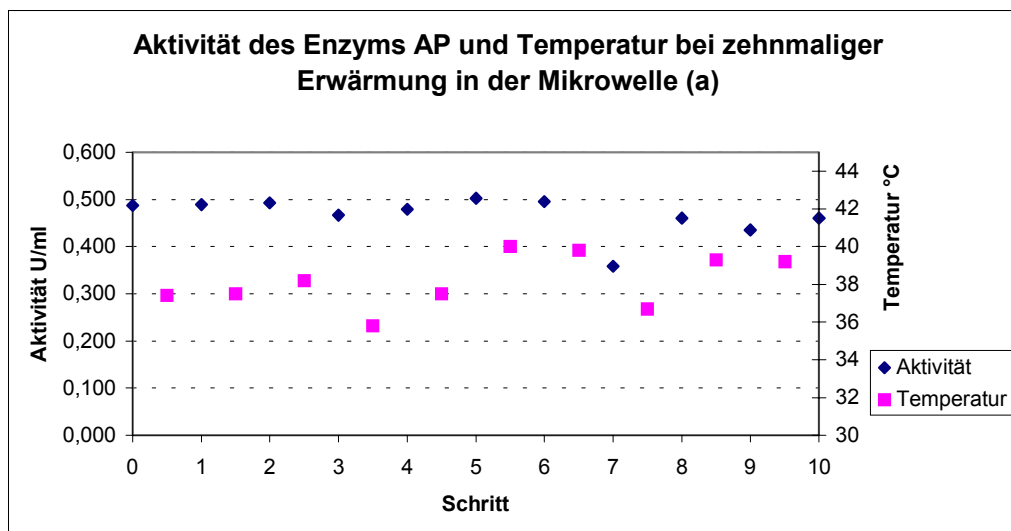


Abb. 3.18: Verlauf der Aktivität des Enzyms AP und der Temperatur bei zehnmaliger Erwärmung in der Mikrowelle (a) und nachfolgender Abkühlung; nach [Poppitz 1997]

Um für den vorliegenden Fall des Enzyms AP eine Aussage zu erhalten, wurde der Einfluß einer mehrfachen Erwärmung mit Mikrowellen auf die Enzymaktivität untersucht. Dazu wurde das eingefrorene Enzym AP aus Speisebrei aufgetaut. Diese Ausgangslösung hatte eine Aktivität von 0.487 U/ml . Von der 1:100-verdünnten Ausgangslösung wurden $150 \mu\text{l}$ in einer Lösung aus 60 ml 1 M Diethanolamin (Abk. DEA) $\text{pH}=9.8$ und 0.1 Masse\% Rinder-Albumin verrührt. Mit einem Teil dieser Lösung wurde bei 25°C die Enzymaktivität im Uvikon 933 gemessen und als Ausgangswert Schritt 0 in Abb. 3.18 eingetragen. Dieser Teil der Lösung war keiner Mikrowellenbestrahlung ausgesetzt. Ein weiterer Teil der Lösung wurde bei 0°C

beginnend im Garraum einer Mikrowelle (a) mit 900 W Leistung wieder zur Vermeidung eines Tastverhältnisses <1 für 18 s auf dem Drehteller erwärmt. Die danach gemessene Temperatur wurde in Abb. 3.18 rechts von Schritt 0 eingetragen; die Lösung auf 25°C abgekühlt, die Enzymaktivität gemessen, als Schritt 1 in Abb. 3.18 eingetragen und die Lösung dann in Eiswasser weiter auf 0°C abgekühlt. Der Zyklus Erwärmen in der Mikrowelle (a) – Abkühlen auf 25°C – Messen – weiter Abkühlen auf 0°C wurde noch neunmal wiederholt [Poppitz 1997].

Die in Abb. 3.18 gezeigte Enzymaktivität nimmt auch nach mehrfacher Bestrahlung mit Mikrowellen nicht eindeutig ab. Es ist weder ein mit der Bestrahlungsdauer stetiges Absinken der Enzymaktivität zu erkennen, was eine schleichende Zerstörung der AP-Moleküle ausschließt, noch ein plötzliches Absinken nach der ersten Bestrahlung zu finden, was einen bestrahlungsdauerunabhängigen Initialschaden ausschließt. Nach diesem Versuchsergebnis hat die Mikrowellenbestrahlung keine negativen Folgen für das Enzym AP.

Die Bestrahlung des Enzyms AP mit Mikrowellen hat sich nicht eindeutig in Form einer Aktivitätsabnahme ausgewirkt, obwohl im Vergleich zur Literatur sehr hohe Leistungsdichten verwendet wurden. Dieses Ergebnis läßt es sinnvoll erscheinen, die Erwärmung der Lösung in einer befüllten MTP mittels Mikrowellen genauer zu untersuchen.

3.3.2. Erwärmung im Mikrowellenfeld

Für die Bestimmung der für die Erwärmung wesentlichen Faktoren ist die Kenntnis

- der komplexen Dielektrizität $\epsilon_r(j\omega)$ von Wasser,
- der spezifischen elektrischen Leitwerte κ aller verwendeten Lösungen und
- der im Wasser wirksamen elektrischen Feldstärke E_{Wasser} wichtig.

Die ersten beiden Punkte werden in den Anhängen F und G behandelt.

Die Erwärmung im Mikrowellenfeld wird ebenso wie im Kondensatorfeld (Anhang G) durch ein elektrisches Feld hervorgerufen, jedoch hat dieses hier eine deutlich höhere Frequenz. Es existieren keine Elektroden zur Erzeugung des elektrischen Feldes. Es wird von einer stehenden oder fortlaufenden elektromagnetischen Welle erzeugt.

Die frequenzabhängigen Daten in Tabelle 3.13 wurden mit den Gleichungen (F2) und (F3) ermittelt und die frequenzunabhängigen Daten aus Tabelle G2 übernommen. Sie stimmen für die folgenden Berechnungen mit [Püschner 1964 S.274] gut überein. Wasser hat nach Tabelle 3.13 bei 25°C und 2.45 GHz eine komplexe Dielektrizität von $75.7 - j \cdot 12.2$ und bei 37°C entspr. $73.4 - j \cdot 7.8$. Die gegenüber dem Kondensatorfeld größeren Imaginärteile bedeuten nach Gleichung (F4) größere Wirkanteile am gesamten Leitwert.

	25°C	37°C
τ_m	12.5 ps	9.23 ps
$\omega \cdot \tau_m = 2 \cdot \pi \cdot f \cdot \tau_m$	0.192	0.142
$\epsilon_{r,I}$	12.1	18.5
$\epsilon_{r,II}$	66	56
$\epsilon_r'(\omega)$	75.7	73.4
$\epsilon_r''(\omega)$	12.2	7.8

Tabelle 3.13: Relaxationszeiten τ_m und Dielektrizitäten ϵ_r von Wasser bei 25 und 37°C, $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 2.45$ GHz

Der Einfluß des spezifischen elektrischen Leitwertes κ der Lösung auf die Aufheizzeit wurde durch folgenden Versuch ermittelt: Ein Becherglas mit 100 ml Aqua dest wurde 30 s bei 900 W Leistung im Rechteckresonator der Mikrowelle (a) erwärmt. Es wurde die maximale Leistung von 900 W gewählt, um ein Tastverhältnis < 1 zu vermeiden. Der Temperaturanstieg betrug 33.8°C. Der gleiche Versuch wurde mit den Puffern TRIS und DEA wiederholt, jeweils ohne und mit Zusatz von 78 μ M Kresolrot bzw. 1 μ M Fluorescein. In allen vier Versuchen lag der Temperaturanstieg zwischen 31.3 und 33°C. Das Verhältnis der erreichten Temperaturanstiege kennzeichnet den Einfluß des spezifischen elektrischen Leitwertes κ auf die Aufheizzeit. Da das Verhältnis fast 1 beträgt, liegt praktisch keine Beeinflussung vor. Die Ionen der im Wasser gelösten Stoffe können also dem Wechselfeld nicht mehr folgen, so daß bei der Erwärmung durch Mikrowellen im weiteren der spezifische elektrische Leitwert κ der Lösung nicht mehr berücksichtigt werden muß.

Es ergibt sich für 25°C ein elektrisches Ersatzschaltbild für Wasser nach Abb. 3.19, wobei vereinfachend eine gefüllte Wanne statt einer gefüllten MTP angenommen wurde, die im Hohlleiter liegt und seitlich von der elektrischen Feldstärke \underline{E} getroffen wird.

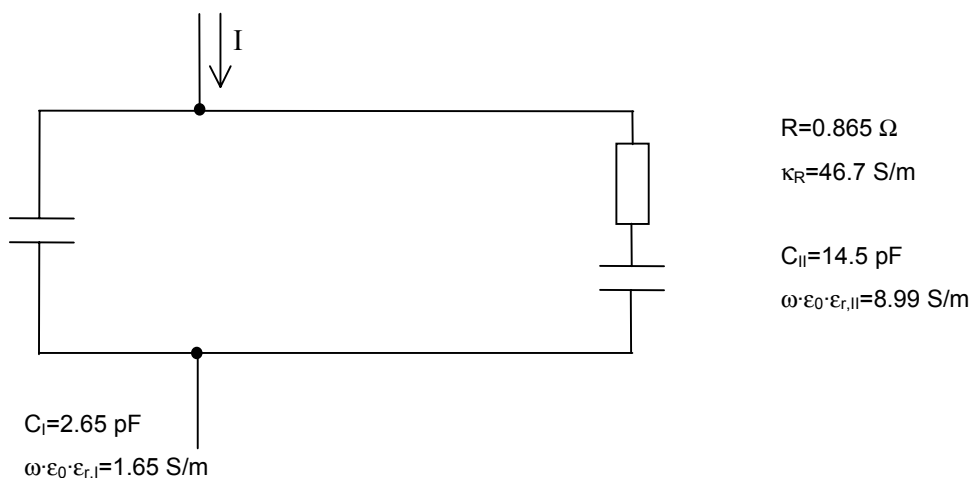


Abb. 3.19: Elektrisches Ersatzschaltbild der dielektrischen Erwärmung von Wasser im Mikrowellenfeld mit $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 2.45$ GHz; Die Einspeisung des Stromes I steht symbolisch für das Wirken des Mikrowellenfeldes im Hohlleiter. Das Umrechnen der Werkstoffgrößen in konzentrierte Bauelemente geschieht mit folgenden Parametern: 25°C, $d = 4$ cm (Hohlleiterbreite), Fläche $A = 13.5 \cdot 0.73 \, \text{cm}^2 \approx 9.9 \, \text{cm}^2$ ($V = 250 \, \mu\text{l}$ in Greiner F-MTP); $\epsilon_{r,I}$, $\epsilon_{r,II}$, τ_m aus Tabelle 3.13; C_I ist der Anteil der Verschiebungspolarisation, C_{II} der der Orientierungspolarisation; R ist der Verlustwiderstand: Mit $R = \tau_m / C_{II}$ kann κ_R berechnet werden.

Die Größen κ_R aus den Abb. G1 und 3.19 sind praktisch gleich groß. Sie beinhalten in beiden Fällen nur Konstanten: $\kappa_R = d/(R \cdot A) = \epsilon_0 \cdot \epsilon_{r,II} / (R \cdot C_{II}) = \epsilon_0 \cdot \epsilon_{r,II} / \tau_m$.

Zur Beurteilung der Leitwert-Verhältnisse wird die Serienschaltung C_{II}, R in eine jetzt frequenzabhängige Parallelschaltung C_{II}^*, R^* umgerechnet (Abb. 3.20). Es existiert nur ein einziger ohmscher Widerstand. Sein Anteil am Gesamtleitwert beträgt bei 25°C 1.67 S/m und bei 37°C 1.06 S/m (Rechnung nicht aufgeführt). Damit gibt es keine anderen Wärme-erzeugungsmechanismen. Im Hohlleiter wirkt lediglich die dielektrische Erwärmung.

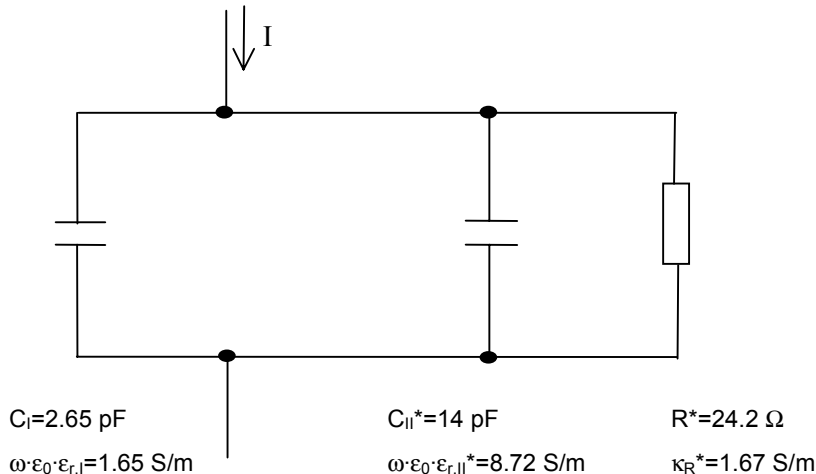


Abb. 3.20: Elektrisches Ersatzschaltbild der dielektrischen Erwärmung von Wasser im Mikrowellenfeld mit $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 2.45$ GHz wie in Abb. 3.19, jedoch wurde wegen der Übersichtlichkeit die Reihenschaltung bestehend aus R und C_{II} in eine Parallelschaltung bestehend aus R^* und C_{II}^* umgerechnet. Sternchengrößen in dieser Abbildung sind das Ergebnis der Umwandlung einer Reihenschaltung in eine Parallelschaltung.

Der Spitzenwert der im Hohlleiter erreichbare elektrischen Feldstärke beträgt ohne Dielektrikum im Hohlleiter

$$|\underline{E}_S| = 159.6 \text{ V/cm} \quad (3.9).$$

Die Berechnung des Ergebnisses nach Gleichung (3.9) geschieht über die Kenntnis des Poyntingschen Vektors der Mikrowelle (b) und des Wellenwiderstandes im Hohlleiter. Der Poyntingsche Vektor, hier das Produkt aus elektrischer Feldstärke \underline{E}_y und magnetischer Feldstärke \underline{H}_x , beschreibt die Leistungsdichte im Hohlleiter (Abmessungen: $8 \text{ cm} \cdot 4 \text{ cm} = 32 \text{ cm}^2$, sinusförmige Anregung): $|\underline{E}_y| \cdot |\underline{H}_x| / 2 = 700 \text{ W} / 32 \text{ cm}^2$. Der Wellenwiderstand im Hohlleiter beträgt nach [Püschner 1964 S.109] mit Freiraumwellenlänge $\lambda_0 = 12.2 \text{ cm}$, Grenzwellenlänge $\lambda_c = 16.0 \text{ cm}$ für den o.g. Querschnitt und angeregten H_{10} -Mode $Z = |\underline{E}_y| / |\underline{H}_x| = 581.9 \Omega$. Das Auflösen beider Gleichungen nach $|\underline{H}_x|$, Gleichsetzen und nachfolgendes Berechnen von $|\underline{E}_y|$, welches die für die Erwärmung wirksame Feldstärke $|\underline{E}|$ ist, liefert das Ergebnis nach Gleichung (3.9).

Diese muß aber wegen der Dielektrizität des Wassers kleiner sein. Mit den Werten $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 2.45 \text{ GHz}$ und 25°C (Tabelle 3.13) und

$$|\underline{\epsilon}(j \cdot \omega)| = \sqrt{\epsilon_r'(\omega)^2 + \epsilon_r''(\omega)^2} = 76.7 \quad (3.10)$$

kann der Spitzenwert der elektrischen Feldstärke in Wasser höchstens

$$159.6 \text{ V/cm} / 76.7 = 2.08 \text{ V/cm} \quad (3.11)$$

betragen. Damit beträgt P' nach Gleichung (F6) 36 mW/cm^3 mit den Daten aus Tabelle 3.13 für 25°C . Unter Berücksichtigung der Dichte und der spezifischen Wärmekapazität von Wasser ergibt sich mit $W=m \cdot c \cdot \Delta\vartheta$ ein erreichbarer Temperaturanstieg von

$$\Delta\vartheta/\Delta t = 0.0086^\circ\text{C/s} \quad (3.12).$$

Wie noch gezeigt wird, ist der tatsächlich erreichbare Temperaturanstieg größer. Aufgrund der Verfügbarkeit handelsüblicher Mikrowellengeräte und der vorstehenden Betrachtungen wurde dieser Lösungsansatz näher untersucht.

Zunächst wurde der Rechteckresonator auf seine Verwendbarkeit für die schnelle homogene Temperierung untersucht. Es wurde eine MTP mit $150 \mu\text{l}$ Wasser je Well gefüllt und in der Mikrowelle (a) erwärmt. Nach Ablauf der Heizzeit wurde mit dem DTMS $5\dots 60^\circ\text{C}$ in ausgewählten Wells die Temperatur gemessen. Eine Messung der Temperatur im Well während des Aufheizens scheidet aus, da die dann in den Sensorzuleitungen induzierte hohe Spannung die Zerstörung des DTMS $5\dots 60^\circ\text{C}$ hervorriefe. Eine versuchsshalber angefertigte elektrische Ersatzschaltung des Thermometers wurde während der Aufheizzeit zerstört.

Bei 15 s Heizzeit ist die Temperatur im Well um bis zu 20°C höher gewesen als zu Anfang. Die Homogenität war nicht zufriedenstellend. Ohne Verwendung des Drehtellers kamen Temperaturunterschiede von Well zu Well von bis zu $15\dots 20^\circ\text{C}$ zustande, abhängig von der Position der MTP im Rechteckresonator. Mit Drehteller kamen Temperaturunterschiede von Well zu Well von bis zu $3\dots 4^\circ\text{C}$ zustande, abhängig von der Position der MTP auf dem Drehteller. Mehrere ausgewählte Wells zeigten untereinander Temperaturunterschiede von bis zu 2°C , bei Aufkleben einer selbstklebenden Folie auf die MTP während der Erwärmung zwecks Verdunstungsschutz von bis zu 1.5°C . Um lokale Überhitzungen zu vermeiden, wurde die Heizzeit in zwei oder mehrere kleine Intervalle zerlegt. In den dazwischenliegenden Pausen findet durch Wärmeleitung Homogenisierung und Abkühlung statt. Die besten Ergebnisse waren zu erhalten, wenn die MTP in der Mitte des Drehtellers steht und für 3-5 s mit Pause dazwischen geheizt wurde.

Eine weitere Verbesserung der Homogenität könnte durch diffuses Streuen der Mikrowellen erreicht werden. Es sind jedoch keine Streuscheiben für Mikrowellen bekannt, die ähnlich Milchglas bei sichtbarem Licht ein auftreffendes inhomogenes Feld nur diffus hindurchlassen, also homogenisieren. Der Rechteckresonator ist als Ort der Erwärmung somit ungeeignet. Daraus folgt, daß man sich eine Stelle im Verlaufe des Weges der Mikrowellen suchen muß, an der die elektrische Feldstärke voraussichtlich noch homogen oder definiert inhomogen verteilt ist im Vergleich zur Verteilung im Rechteckresonator. Das ist der Hohlleiter.

Es wird der Rechteckresonator als Ort der Temperierung grundsätzlich verlassen. Damit ist auch die lokal nicht verschiebbare Feldstärkeverteilung wie im Rechteckresonator, ab-

gesehen von Reflexionen im Bereich der MTP und an der Einkoppelstelle zum Rechteckresonator, nicht mehr vorhanden. Es handelt sich im Hohlleiter um eine Erwärmung im fortlaufenden Mikrowellenfeld. Im Gegensatz dazu steht die Erwärmung im Rechteckresonator. Dort handelt es sich um ein stehendes Mikrowellenfeld.

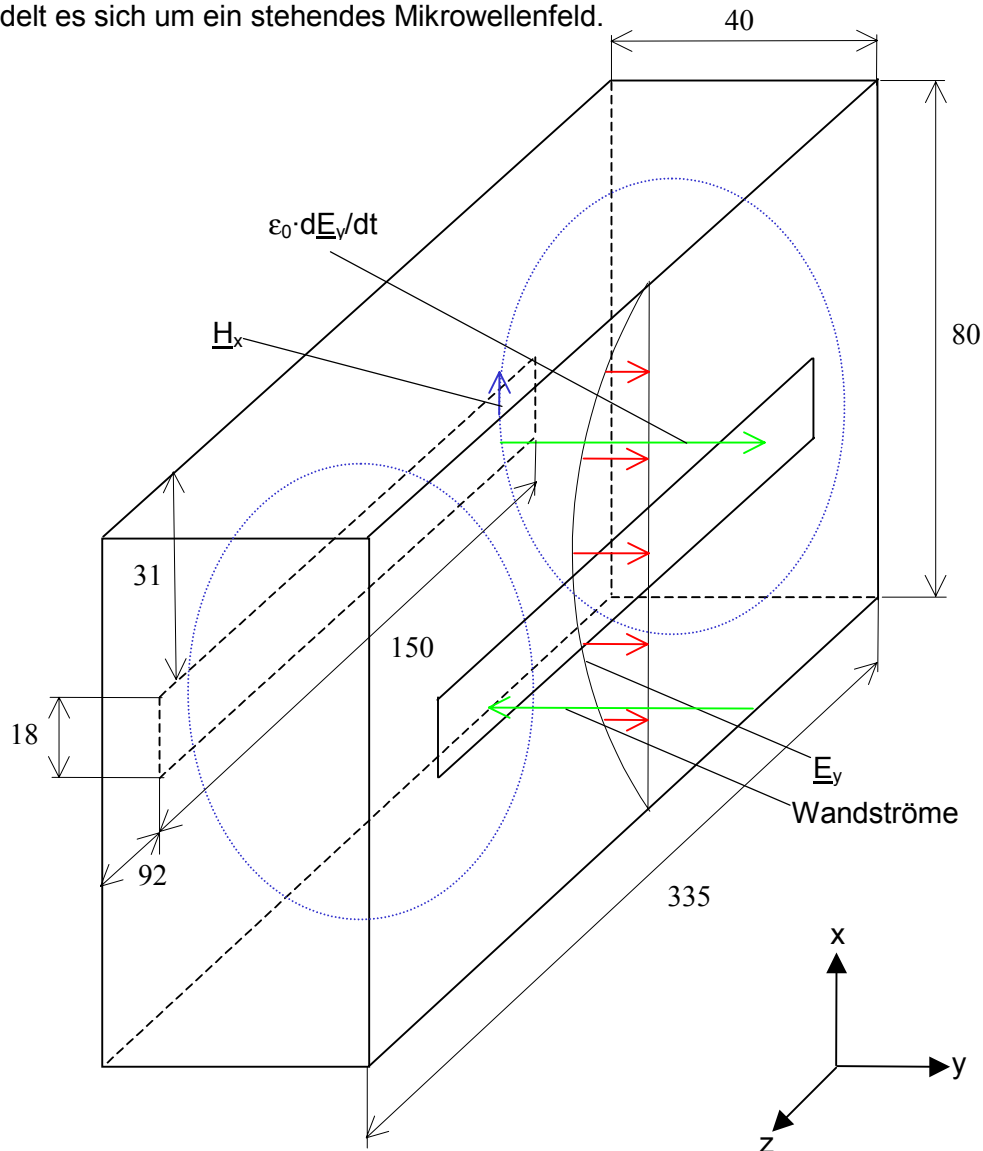


Abb. 3.21: Skizze des mit seitlichen Öffnungen ausgestatteten Hohlleiterstückes; Die Öffnungen müssen in der breiten Seite des Hohlleiters eingebracht werden, weil der angeregte Mode H_{10} in den schmalen Hohlleiterseiten Wandströme fließen lässt, die von den Schlitzten unterbrochen würden.

Die MTP paßt in die Hohlleiterquerschnittsfläche von $A_H = 8 \text{ cm} \cdot 4 \text{ cm}$ der Mikrowelle (b) nicht hinein. Es müssen deshalb Öffnungen im Hohlleiter eingebracht sein, die ein Durchschieben der MTP gestatten. Auf diese Art und Weise dürfte im Hohlleiter in der Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen eine homogene oder definiert inhomogene Erwärmung auftreten. In der Richtung quer zur Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen soll die Homogenität durch eine konstante Verfahrensgeschwindigkeit realisiert werden. So eine Vorrichtung wurde mit Hilfe einer Mikrowelle (b) gebaut. Gegenüber dem Originalzustand der Mikrowelle (b) wurde zwischen Magnetron und Rechteckresonator ein 335 mm langes Hohlleiterstück angebracht (Abb. 3.21 u. 3.22). Dieses dient erstens der Ausbildung von wenigstens einer vollständigen

Hohlleiterwellenlänge und zweitens dem Durchschieben der MTP durch den Hohlleiter durch Schlitz in seiner Breitseite.

Die Öffnungen wurden an der Breitseite mittig angebracht, weil dort die elektrische Feldstärke E_y am größten ist. In Abb. 3.21 ist die Skizze eines derart geänderten Hohlleiterstückes einschließlich wichtiger Feldgrößen und Ströme dargestellt. In ein solches Hohlleiterstück, eingebaut in der Mikrowelle (b), wurde eine mit TRIS-Kresolrot-Lösung befüllte MTP eingebracht. Im Rechteckresonator wurde eine Grundlast von 0.5 l Wasser positioniert. In Abb. 3.23 wird das Ergebnis dieses Aufheizversuches im Hohlleiter ohne Bewegung der MTP gezeigt.

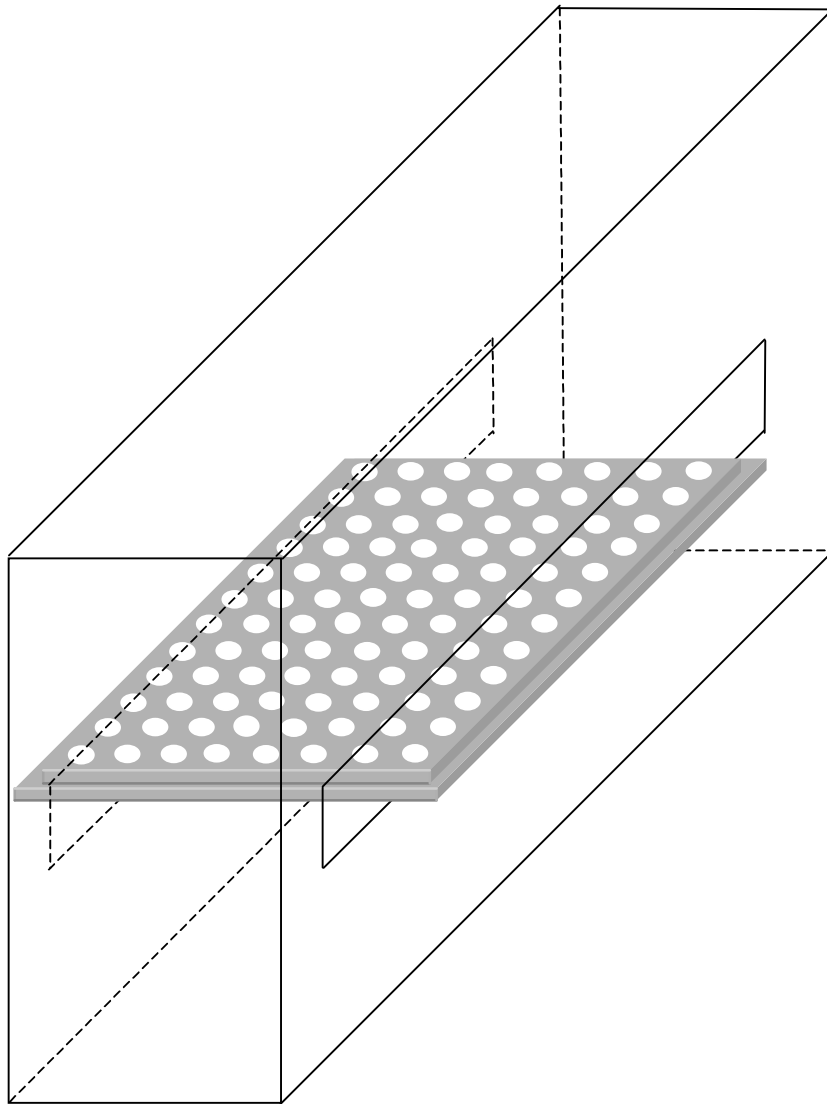
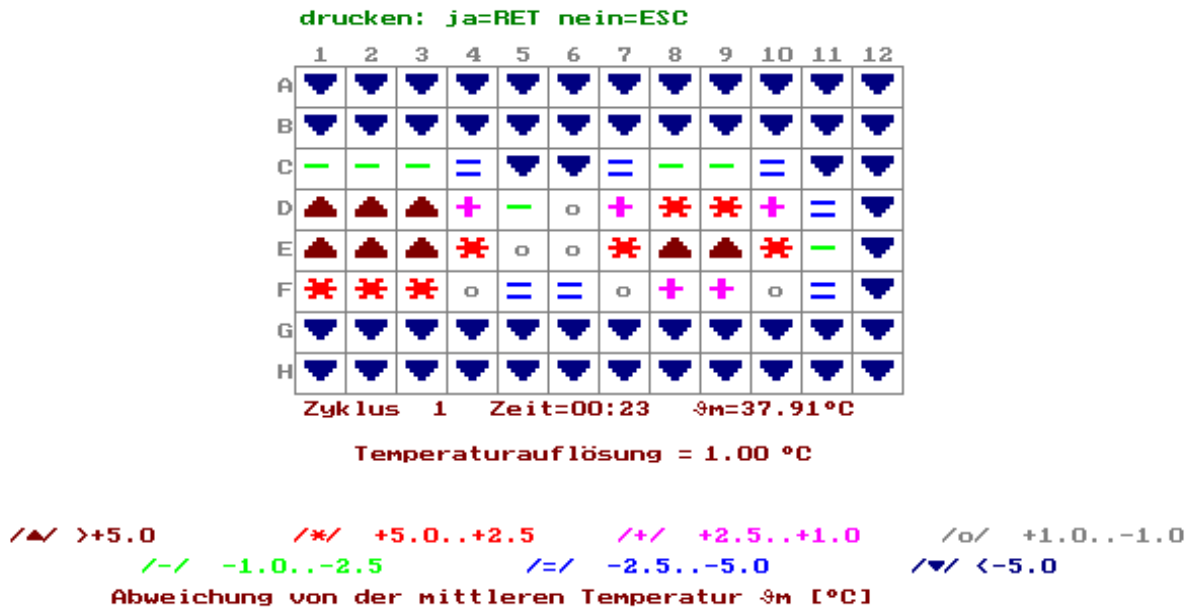


Abb. 3.22: Skizze des mit Öffnungen versehenen Hohlleiterstückes mit darin enthaltener MTP, Halterungsmechanik nicht gezeichnet

Es ist nicht gelungen, reproduzierbare Temperaturverteilungen beim Bewegen der MTP durch den Hohlleiter zu erzeugen, weil das Magnetron während des Durchziehens der MTP durch den Hohlleiter sehr oft ausgeschaltet wird. Untersuchungen hierzu ergaben eine Abhängigkeit vom Füllvolumen der MTP. Die Parameter Abstand zum Magnetron, Winkel zur

Hohlleiterlängsachse und Anfangstemperatur des Magnetrons zeigen ebenfalls einen Einfluß auf das Abschaltverhalten. Eine in gleicher Lage befindliche bzw. gleichermaßen bewegte unbefüllte MTP führt hingegen nicht zur Abschaltung.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	19.58	20.33	20.36	20.33	20.22	20.38	20.33	20.70	20.51	20.17	19.83	19.36
B	23.46	24.97	24.47	23.87	23.33	23.59	24.42	24.88	24.84	23.81	22.35	21.38
C	35.78	36.34	35.61	33.39	31.42	31.81	33.89	35.99	35.90	33.42	30.24	27.93
D	43.81	44.65	43.10	39.61	36.82	36.99	39.65	42.91	42.85	39.45	34.80	32.21
E	45.18	45.55	44.63	42.38	37.72	37.90	40.72	44.15	44.18	40.60	35.63	32.20
F	41.49	42.14	41.23	37.71	34.79	35.03	37.55	39.95	40.06	37.40	33.02	30.11
G	30.46	31.78	31.60	29.53	27.96	27.80	29.03	30.44	30.30	28.99	26.45	24.42
H	21.34	22.65	22.65	22.23	21.74	21.60	21.76	21.65	21.68	21.68	20.90	20.38

Spalten

ms=41.57 42.17 41.14 38.27 35.19 35.43 37.95 40.75 40.75 37.72 33.42 30.61
 vs= 9.98 9.83 9.58 9.87 7.94 7.61 7.93 8.91 8.98 8.37 7.14 6.67

Zeilen

	A	B	C	D	E	F	G	H
mz=	***	***	33.48	39.74	40.90	37.54	***	***
vz=	***	***	7.99	9.86	10.43	9.90	***	***

alle Pos. innere Pos.

mg= 37.91 mi= 38.28 ms/mz/mg/mi = Mittelwert Sp./Z./ges.PI./inn.PI.

vg= 12.07 vi= 10.66 vs/vz/vg/vi = Var.Koeff. Sp./Z./ges.PI./inn.PI. %

Mmg=17.62 Mmi=15.31 Mmg/Mmi=Max-Min ges.PI./inn.PI.

Abb. 3.23: Temperaturen in °C und VK in % bei Erwärmung von 200 µl 78 µM Kresolrot in 0.1 M TRIS pH=7.98 bei 21.9°C in Greiner F-MTP im Hohlleiterstück der Mikrowelle (b), Heizzeit 20 s, Leistung 700 W, Anfangstemperatur 21°C, unterstrichene Zeilen waren im Hohlleiter, MTP nicht bewegt, Magnetron rechts von Spalte 12, Rechteckresonator links von Spalte 1, für Statistik-Rechnung nur die unterstrichenen Zeilen C,D,E,F benutzt

Räumlich gesehen zeigt der für die Erwärmung verantwortliche Vektor der elektrischen Feldstärke senkrecht von Zeile C in Richtung Zeile F und umgekehrt. Genau diese Zeilen sind auch stark erwärmt worden. Der im Hohlleiter erreichte Temperaturanstieg beträgt im Mittel

$$\Delta\vartheta/\Delta t = (37.91^\circ\text{C} - 21.9^\circ\text{C})/20\text{s} = 0.8^\circ\text{C/s} \quad (3.13)$$

und liegt damit deutlich über dem nach Gleichung (3.12) vorausgesagten Wert. Aus der Grundgleichung der Wärmelehre folgt $P' = 3.35\text{W/cm}^3$, und mit Gleichung (F6) folgt für den dafür nötigen Spitzenwert der elektrischen Feldstärke

$$|\underline{E}_s| = 20.1\text{ V/cm} \quad (3.14).$$

Der hohe Temperaturanstieg muß daran liegen, daß die im Wasser wirkende elektrische Feldstärke deutlich größer ist als bei der Berechnung nach Gleichung (3.11) ermittelt wurde. Dafür spricht, daß die MTP kein homogenes Dielektrikum darstellt, wie bei der Berechnung angenommen. In den Wellzwischenräumen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung sowie in dem Raum ober- und unterhalb der MTP verlaufen ebenfalls Feldstärkevektoren \underline{E} . Sie gehen nicht durch das Wasser hindurch und werden deshalb nicht vom Wasser geschwächt. Sie liegen parallel zu denjenigen Feldstärkevektoren \underline{E} , die durch das Wasser hindurchgehen und deshalb geschwächt sind. In den Wellzwischenräumen parallel zur Ausbreitungsrichtung verlaufen aber Äquipotentiallinien, d.h., die geschwächten und die ungeschwächten Feldstärkevektoren \underline{E} überbrücken von Äquipotentiallinie zu Äquipotentiallinie die gleiche Spannung. Hieraus ist zu schlußfolgern, daß die geschwächten Feldstärkevektoren \underline{E} größer sind als mit Gleichung (3.11) berechnet und die ungeschwächten kleiner sind als mit Gleichung (3.9) berechnet. Einen Richtwert für die tatsächlich wirksame elektrische Feldstärke im Wasser liefert folgende Rechnung: Die elektrische Feldstärke erzeugt mit 159.6 V/cm nach Gleichung (3.9) im 4 cm breiten Hohlleiter eine Spannung von 638 V . Diese teilt sich auf $4 \cdot 0.66\text{ cm}$ Wasser entspr. vier Wells mit $|\underline{E}_r| = 76.7$ aus Gleichung (3.10), $8 \cdot 0.9\text{ mm}$ PS entspr. acht Wellwänden mit $\epsilon_r = 2.5$ und 0.64 cm Luft mit $\epsilon_r \approx 1$ auf. Unter der Berücksichtigung gleicher Verschiebungsflußdichten in allen drei Stoffen ergibt sich der Spitzenwert der elektrischen Feldstärke $|\underline{E}_s|$ in Wasser zu 8.6 V/cm , P' mit Gleichung (F6) zu 616 mW/cm^3 und mit der Grundgleichung der Wärmelehre der Temperaturanstieg zu

$$\Delta\vartheta/\Delta t = 0.147^\circ\text{C/s} \quad (3.15).$$

Dieser Wert liegt schon deutlich besser an Gleichung (3.13) als der vorausgesagte aus Gleichung (3.12), liefert für die elektrische Feldstärke $|\underline{E}_s|$ in Wasser aber immer noch einen gegenüber Gleichung (3.14) um etwa 2.3 zu kleinen Wert: $8.6\text{ V/cm} < 20.1\text{ V/cm}$. Die nächstbessere Berechnung wird man bekommen, wenn man berücksichtigt, daß in beiden auf dem Vektor der elektrischen Feldstärke senkrecht stehenden Richtungen das Dielektrikum nicht homogen verteilt ist.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit und ebenso die Wellenlänge in einem Medium sinken mit der Wurzel seiner relativen Dielektrizität [Philippow 1976 Bd.1 S.27]. Letztere beträgt nach

Gleichung (3.10) für Wasser bei 25°C und 2.45 GHz $|\epsilon_r|=76.7$. Die Wellenlänge der Mikrowellen im Hohlleiter ohne Dielektrikum berechnet sich mit Freiraumwellenlänge $\lambda_0=12.2$ cm, Grenzwellenlänge $\lambda_c=16$ cm und angeregtem H_{10} -Mode mit $\lambda_L^{-2}+\lambda_C^{-2}=\lambda_0^{-2}$ nach [Nimtz 1990 S.37f.] zu $\lambda_L=18.9$ cm. Damit beträgt die Wellenlänge der Mikrowellen in Wasser $18.9 \text{ cm}/\sqrt{76.7} = 2.16$ cm. Die halbe Wellenlänge liegt somit in der Größenordnung der Wellenabmessungen. Daher können Resonanzen der Mikrowellen im Well nicht ausgeschlossen werden. Das haben [Boon u.a. 1989 S.27] experimentell gezeigt. Unter diesen Voraussetzungen gestaltet sich die theoretische Voraussage der Homogenität in Ausbreitungsrichtung unsicher. Folgende Parameter gehen auf jeden Fall ein:

- Abmessungen Querschnitt und Höhe des Flüssigkeitszylinders im Well und
- Lage des Wells bzgl. der Nähe zur Quelle.

Experimentell stellte sich heraus, daß die Temperaturverteilung in Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen Maxima und Minima hat. Die Welligkeit ist aus Abb. 3.23 erkennbar. Aus der Existenz der Maxima und Minima folgt die Existenz eines reflektierten Anteils. Er wird mit Hilfe des Stehwellenverhältnisses s bestimmt. Dieses ist für Spannungen entspr. Feldstärken definiert. Die Temperaturdifferenz zur Anfangstemperatur geht aber quadratisch mit der elektrischen Feldstärke, also muß aus dem Quotienten der Temperaturdifferenzen noch die Wurzel gezogen werden:

$$s = \frac{|U_{\max}|}{|U_{\min}|} = \frac{|E_{\max}|}{|E_{\min}|} = \sqrt{\frac{\Delta\vartheta_{\max}}{\Delta\vartheta_{\min}}} \approx \sqrt{\frac{45-20}{37-20}} = 1.21.$$

Damit ergibt sich der Betrag des Reflexionsfaktor r zu

$$r = \frac{s-1}{s+1} = \frac{0.21}{2.21} = 0.095.$$

Dieser Reflexionsfaktor reicht offensichtlich aus, um das Magnetron zum Abschalten zu bringen. Es ist anzumerken, daß der erwartete Abstand der Temperaturmaxima im Hohlleiter nicht dem gemessenen entspricht: Erwartet wurde der Abstand einer halben Hohlleiterwellenlänge von $\lambda_L/2 \approx 9.5$ cm, gemessen wurden 5 cm (Abb. 3.23 Zeilen D und E). Eine Ursache kann sein, daß die Reflexion der Mikrowellen nicht an einer bestimmten Fläche, sondern an mehreren Flächen, genauer an den zwölf Spalten der MTP, erfolgt, wobei jede Fläche etwas weniger Energie bekommt als ihre Vorgängerin. Mehrfachreflexionen sind denkbar. Eine andere Ursache kann die im Wasser viel geringere Wellenlänge der Mikrowellen sein. Dann überlagern sich Mikrowellen mit verringerter und nicht verringerter Wellenlänge und führen zu einer Feldstärkeverteilung, die der Summe aller Anteile entspricht. Die Wellenlänge der Summe aller Anteile wird am stärksten durch den Anteil mit der größten Amplitude bestimmt. Diese Wellenlänge beträgt $\lambda/2=5$ cm (Abb. 3.23), woraus sich mit dem Zusammenhang $v=\lambda \cdot f$ zwischen Ausbreitungsgeschwindigkeit v , Wellenlänge λ und

Frequenz f sowie mit dem Zusammenhang $v^2/(\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \mu_0 \cdot \mu_r) = 1$ zwischen Ausbreitungsgeschwindigkeit v , Dielektrizität $\epsilon_0 \cdot \epsilon_r$ und Permeabilität $\mu_0 \cdot \mu_r$ die durchschnittliche relative Dielektrizität $\epsilon_{r,m}$ des Dielektrikums im Hohlleiter zu $\epsilon_{r,m} = (9.5 \text{ cm}/5 \text{ cm})^2 = 3.61$ bestimmen läßt. Das Verhältnis von $\epsilon_{r,m}$ und dem Betrag der relativen Dielektrizität $|\epsilon_{r,\text{Wasser},2.45 \text{ GHz}}|$ nach Tabelle 3.13 und Gleichung (3.10) ist

$$\frac{\epsilon_{r,m}}{|\epsilon_{r,\text{Wasser},2.45 \text{ GHz}}|} = \frac{3.61}{76.7} \approx 0.047 \quad (3.16).$$

Betrachtet wird nun das Verhältnis der von Wasser in den Wells bedeckten Fläche in Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen im Hohlleiter zur Hohlleiterquerschnittsfläche: Die von der Lösung bedeckte Fläche ergibt sich aus der Seitenansicht von vier befüllten Wells (Abb. 3.23, $d=5.8 \text{ mm}$ mit $V=200 \mu\text{l}$, mittlerer Well-Durchmesser einer Greiner F-MTP: $2 \cdot r_0=6.5 \text{ mm}$): $A=4 \cdot 5.8 \cdot 6.5 \text{ mm}^2=150.8 \text{ mm}^2$. Die Hohlleiterquerschnittsfläche beträgt bei der Mikrowelle (b), die keinen genormten R26-Hohlleiter hat, $A_H=80 \cdot 40 \text{ mm}^2$. Damit ergibt sich das Flächenverhältnis zwischen Lösung und Hohlleiter zu

$$\frac{A}{A_H} = \frac{150.8 \text{ mm}^2}{3200 \text{ mm}^2} \approx 0.0471 \quad (3.17).$$

Die gute Übereinstimmung der Quotienten aus den Gleichungen (3.16) und (3.17) berechtigt zu der Schlußfolgerung, daß die Temperaturmaxima und –minima durch Reflexion und die verkürzte Wellenlänge im Hohlleiter durch die relative Dielektrizität des Wassers hervorgerufen werden.

Es ist anzunehmen, daß nach dem Einbau eines Zirkulators a) reproduzierbare Messungen durchgeführt werden können, da die Abschaltung des Magnetrons entfällt und b) der Verlauf der Inhomogenität in Ausbreitungsrichtung sich gegenüber Abb. 3.23 nicht wesentlich ändern wird, denn es entfallen nur die von der MTP reflektierten Anteile, die vom Magnetron bzw. seiner Einkoppelstelle nochmals reflektiert werden.

Die praktisch erreichte Homogenität ist in beiden Richtungen nicht zufriedenstellend. Die Homogenisierung quer zur Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen zum Erreichen konstanter Temperaturen in Richtung von einer zur gegenüberliegenden Öffnung wird voraussichtlich durch einen elektromechanischen Antrieb für das Durchziehen oder –schieben der MTP durch die Hohlleiteröffnungen erreicht werden können. Die Aufgabe der Homogenisierung in Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen muß anders gelöst werden. Wenn die gemessenen Homogenitäten reproduzierbar sind, könnte man unter der MTP formschlüssig ein Stoffgemisch mit ortsabhängiger komplexer Dielektrizität $\underline{\epsilon}_r(j \cdot \omega)$ anbringen. Ihr Imaginärteil $\epsilon_r''(\omega)$ wirkt nach Gleichung (F6) auf P' . An Stellen schlechterer Erwärmung der Flüssigkeit in der MTP müßte sich ein höheres $\epsilon_r''(\omega)$ befinden, weil an diesen Stellen dann eine stärkere Erwärmung eintritt [Buß 1998].

Eine andere Möglichkeit zur Homogenisierung in Längsrichtung ist der Einsatz eines zur MTP passenden Körpers, ein Abdruck, mit sehr hohem Wärmeleitwert zwecks schnellem Temperatúrausgleich und sehr niedrigem elektrischen Leitwert zur Verhinderung von Reflexionen. Folgende Materialien kommen in Frage:

- Berylliumoxid BeO : 174 W/(m·K), teuer, schwer zu bearbeiten, toxisch
- Aluminiumnitrid AlN : 170-200 W/(m·K), teuer, schwer zu bearbeiten
- Siliziumkarbid SiC : 90 W/(m·K), nicht alleine verwendbar, da halbleiterhafte Strukturen, hart, spröde, brüchig, Fa. HITK
- Aluminiumdioxid Al_2O_3 : 30 W/(m·K), läßt sich gut pressen, schrumpft beim Sintern, gängiger Werkstoff
- Diamant: mit 33000 W/(m·K) [Römpf 1995] extrem hoher Wärmeleitwert, deutlich über Kupfer mit 398 W/(m·K), sehr hart, teuer
- Siliziumnitrid Si_3N_4 : 40 W/(m·K), Fa. Bach RC
- Bornitrid BN : 40 W/(m·K), Fa. Bach RC

Zwei Möglichkeiten zur Homogenisierung in Längsrichtung sind:

- Hindurchziehen der MTP durch den Hohlleiter, drehen um 180° und zurückziehen
- Hohlleiter um 180° biegen, so daß ein 'U' entsteht und die MTP durch beide Schenkel hindurchziehen. Das Prinzip entspricht dem zur Trocknung von Tapeten, Stoffbahnen u.ä. industrieller Mikrowellentrocknungsanlagen [Püschner 1964, Rudolph u.a. 1989].

Diese beiden Möglichkeiten erfüllen die gestellten Forderungen an die Homogenität nur dann, wenn die Summe aus der Temperaturverteilung und ihrem Spiegelbild in Längsrichtung eine Konstante ist: $f(x)+f(-x)=\text{const.}$ mit $x=0$ in der Mitte der MTP in Längsrichtung. Diese Bedingung wird von folgenden Funktionen erfüllt:

- $f(x)=\text{const.}$: Eine konstante Temperaturverteilung in Längsrichtung kann nicht erwartet werden (vgl. Abb. 3.23).
- $f(x)=a \cdot x + b$: Eine linear wachsende/fallende Temperaturverteilung in Längsrichtung kann ebenfalls nicht erwartet werden.
- $f(x)=a+b \cdot \sin(x-x_0)$ für $x_0=k \cdot \pi$, $k \in \mathbb{G}$: Diese Funktion kommt der Verteilung lt. Abb. 3.23 am nächsten. $x_0=k \cdot \pi$ heißt, die Mitte der MTP in Längsrichtung muß mit einer Nullstelle des Sinus zusammenfallen. Diese Stelle wird am Längsschlitz des Hohlleiters einmalig gesucht. Im Fall des zum 'U' gebogenen Hohlleiters muß diese Stelle an beiden Schenkeln des Hohlleiters gesucht werden. Ihr Ort hängt nur von der mechanischen Konstruktion Magnetron-Einkopplung-Hohlleiterlänge-Hohlleiterabschluß ab. Wählt man die Hohlleiterlänge zwischen den Öffnungen zu $(2 \cdot k + 1) \cdot \lambda_L / 2$, $k \in \mathbb{N}$, wird ein Temperaturminimum aus einem Hohlleiterschlenkel von einem Maximum im anderen getroffen. Die beiden Öffnungen können genau gegenüber liegen. Die MTP kann in einem Arbeitsgang durch beide Hohlleiteröffnungen bewegt werden. Dieser Lösungsgedanke kommt mit der vorhandenen Feld-

stärkeverteilung im Hohlleiter aus, ist auf keinen bestimmten Wellquerschnitt angewiesen und braucht außer dem Magnetron nur noch einen Isolator (=Zirkulator + Absorber).

Ein anderer Gedanke, die Homogenisierung zu verbessern, ist der, ein Mikrowellenfeld mit einem viel größeren Querschnitt als die MTP nicht von der Seite, sondern von oben auf die MTP zu richten. Hierbei bekommen alle Wells die gleiche Energie, da in Ausbreitungsrichtung kein Well hinter einem anderen liegt. Es ist eine Aufweitung der Hohlleiterabmessungen bzw. eine Hornantenne nötig. Beides braucht Platz in Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen. Die Ausbreitungsrichtung muß senkrecht von oben nach unten oder umgekehrt sein. Wenn die Aufheizzeit gehalten werden soll, muß die Leistung des Magnetrons mit dem Hohlleiterquerschnitt in der Ebene der MTP wachsen.

Nach [Rudolph u.a. 1989 S.281] reflektiert ein größeres Volumen Leitungswasser im Rechteckresonator 47 % der Leistung bei senkrechtem Auftreffen und 2.45 GHz. Diese wird jedoch nur geringfügig wieder in den Hohlleiter eingekoppelt, so daß der Arbeitspunkt des Magnetrons nicht unzulässig verschoben wird. Anders dagegen bei Reflektion im Hohlleiter, d.h., vor der Einkoppelöffnung zum Rechteckresonator: Der vom Wasser in der MTP reflektierte Teil der Mikrowellenenergie kehrt vollständig zum Magnetron zurück. Aus der Überlagerung einer hin- und einer zurücklaufenden Welle folgt die Existenz einer stehenden Welle im Hohlleiter zwischen MTP und Magnetron. Sie zeigt sich in Form von Temperaturmaxima und -minima in der MTP in Hohlleiterlängsrichtung (Abb. 3.23). Das Magnetron kommt in einen verbotenen Arbeitspunktbereich. Es wird das zulässige Stehwellenverhältnis überschritten. Eine Arbeitspunktüberwachung des Magnetrons in der Mikrowelle (b) erkennt die Überschreitung und schaltet es aus. Keinesfalls ist einer der in die Mikrowelle (b) eingebauten Bimetall-Thermoschutzschalter für das Abschalten verantwortlich. Um den Arbeitspunkt des Magnetrons im erlaubten Bereich zu halten, muß verhindert werden, daß es zuviel reflektierte Leistung zurückbekommt. Das ist prinzipiell durch den Einbau eines Isolators in den Hohlleiter zwischen Magnetron und MTP möglich. Die reflektierte Energie kommt so nicht zum Magnetron zurück, sondern wird durch den Zirkulator auf den Absorber geleitet. Es stehen Angebote verschiedener Firmen zur Auswahl:

- WVS: 980.- DM
- ACAL: 80·40 mm², 950.- DM
- semic: R26, 3845.- DM
- MUEGGE: R26, 3890.- DM

Ein solcher Isolator muß den stabilen Betrieb des Magnetrons sichern. Eine Alternative dazu ist der Versuch, bei einer der Mikrowellenfirmen eine Baugruppe Stromversorgung-Magnetron-Hohlleiterankopplung-Isolator auszuleihen. Damit könnte die prinzipielle Richtigkeit der bisherigen Überlegungen überprüft werden. Aus offenbar kommerziellen Gründen ist dieser

Versuch nicht erfolgreich verlaufen, so daß kein direkter Beweis für die Arbeitspunktverschiebung des Magnetrons erbracht werden kann.

Die ohne Isolator aufgebaute Vorrichtung zur MTP-Erwärmung erweist sich als nicht praktikabel. Die Aufgabenstellung ist wegen des Abschaltverhaltens nicht erfüllbar. Ein erhöhter materieller Einsatz in Form eines Isolators verspricht die Beseitigung dieses Effektes. Danach können Untersuchungen zur Homogenisierung in Ausbreitungsrichtung der Mikrowellen vorgenommen werden.

Insgesamt bleibt festzustellen, daß die eingangs geforderte Aufheizzeit von 1...2 min eingehalten wird. Mit einer Leistung von 700 W im Hohlleiter, 200 µl TRIS-Kresolrot-Lösung und einer Anfangstemperatur von 21°C werden nach 20 s Lösungstemperaturen zwischen 31 und 44°C erreicht. Die Homogenität der Temperaturverteilung der nach Abb. 3.23 im Hohlleiter erwärmten Wells beträgt 4.6°C. Das Verfahren erlaubt das Verwenden von MTP beliebigen Typs, solange sie keine metallischen Komponenten enthalten. Es funktioniert auch bei einer aufgeklebten Folie. Die Schonung des Analysengutes kann nicht garantiert werden, da es a) starke Inhomogenitäten in der Temperaturverteilung gibt und b) der negative Einfluß sog. nichtthermischer Effekte (Veränderungen am Molekül ohne Temperaturänderung) von Mikrowellen auf biologische Stoffe in der Literatur nicht ausgeschlossen, aber auch nicht bewiesen wird. Die Messung während des Aufheizens ist möglich, wenn der Meßkopf direkt neben einer der Hohlleiteröffnungen angebracht ist. Eine evtl. Beeinflussung der hinter dem Detektor liegenden Empfängerelektronik durch die aus der Hohlleiteröffnung austretenden Streufelder muß experimentell ermittelt werden. Das Magnetron ist in der Lage, sofort nach dem Einschalten Energie abzugeben, d.h., die Erwärmung im Well beginnt verzögerungsfrei. Allerdings wird ein großer Teil der Energie nicht genutzt. Die von der MTP reflektierte Energie muß in einem Isolator zwischen Magnetron und MTP in Wärme umgewandelt werden. Die an der MTP vorbeigeleitete Energie muß hinter der MTP entweder reflektiert oder in einem Absorber ebenfalls in Wärme umgewandelt werden. Der angestrebte Aufwand von 3...4 TDM ist möglicherweise nicht haltbar. Mikrowellengeräte sind zwar schon für Preise um 200.-DM erhältlich, jedoch steht eine entsprechend hohe Stückzahl dahinter. Sobald nicht für den Massenbedarf bestimmte Produkte wie Zirkulator, Absorber und besonders ausgeführte Hohlleiter benötigt werden, gelten selbst für Komponenten deutlich höhere Preise. Auch der Platzbedarf ist nicht zu vernachlässigen. Die Baugruppen Hochspannungsversorgung, Magnetron, Hohlleiter, Zirkulator und Absorber weisen aufgrund der verwendeten hohen Betriebsspannung und der Wellenlänge Mindestabmessungen auf. Insofern kann ein solches Heizprinzip in einen Reader nur unter deutlicher Vergrößerung seines Volumens integriert werden.

4. Das optimale Heizregime

Die im folgenden dargestellten Untersuchungen wurden am Heizkörper des absorbanz-messenden Readers Typ 1400 durchgeführt.

Die Forderung nach möglichst schneller Temperierung des Analysenguts in der MTP - ohne Überschreiten der Solltemperatur - führt zur Suche nach der dafür notwendigen kürzest-möglichen Zeit. Damit wird eine zeitoptimale Steuerung verlangt. Diese kürzestmögliche Zeit hängt von Randbedingungen des Temperiersystems ab. Es ist möglich, mit Hilfe dieser konkreten Randbedingungen den notwendigen Strom-Zeit-Verlauf an der Heizung zu be-rechnen. Dieser Verlauf wird das optimale Heizregime genannt.

Zum möglichst schnellen Erreichen der gewünschten Solltemperatur ist es nötig, die Heizzeit der in den Heizkörper eingebauten Heizung präzise einzustellen. Bei einer zu kleinen Heiz-zeit wird die gewünschte Temperaturänderung nicht erreicht. Bei einer zu großen Heizzeit schwingt die Lösungstemperatur über, was eine länger wirkende zu hohe Reaktions-geschwindigkeit zur Folge hat. Auch mit dem zumindest teilweisen Verlust des eingesetzten Analysengutes ist zu rechnen. Die optimale Heizzeit ist diejenige Zeit, für die die Heizleistung eingeschaltet sein muß, um die Lösungstemperatur ohne Überspringen auf den ge-wünschten Sollwert zu bringen.

Die zweite wichtige Zeit beim schnellen Aufheizen ist diejenige, nach der die Solltemperatur in der Lösung erreicht ist: die Einschwingzeit. Sie ist immer größer als die optimale Heizzeit, weil die Lösungstemperatur der eingespeisten elektrischen Leistung ähnlich einem stark ge-dämpften Tiefpaß zweiter Ordnung folgt.

Damit ist der prinzipielle Strom-Zeit-Verlauf bekannt: Für die Dauer der optimalen Heizzeit wird der verfügbare Strom in die Heizung eingespeist. Seine Höhe ist nur durch technische Randbedingungen begrenzt. Nach Ablauf der Einschwingzeit wird die Lösungstemperatur ohne Überspringen erreicht.

In mehreren Versuchen wurde die optimale Heizzeit in Abhängigkeit vom Lösungsvolumen im Well ermittelt. Dabei wurde für jede Kombination der beiden Parameter gewünschte Temperaturdifferenz und Lösungsvolumen die Heizzeit zunächst nach der Grundgleichung der Wärmelehre berechnet, als erster Versuch verwendet und jeweils in die Bedienober-fläche eingegeben.

Der zeitliche Verlauf der Lösungstemperatur gibt dann den Hinweis, wie die Heizzeit zu korri-gieren ist. Mit der korrigierten Heizzeit wurde mit derselben Parameterkombination und der-selben Anfangstemperatur erneut geheizt. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis für die gegebene Parameterkombination Temperaturdifferenz/Lösungsvolumen die optimale Heizzeit gefunden worden war. Dafür waren 4...5 Versuche notwendig. Um die Übersicht über die beiden Parameter Temperaturänderung und Lösungsvolumen im Well zu wahren,

wird das Verhältnis aus ermittelter optimaler Heizzeit und Temperaturänderung betrachtet. Trägt man dieses Verhältnis über dem Lösungsvolumen im Well auf, entsteht Abb. 4.1.

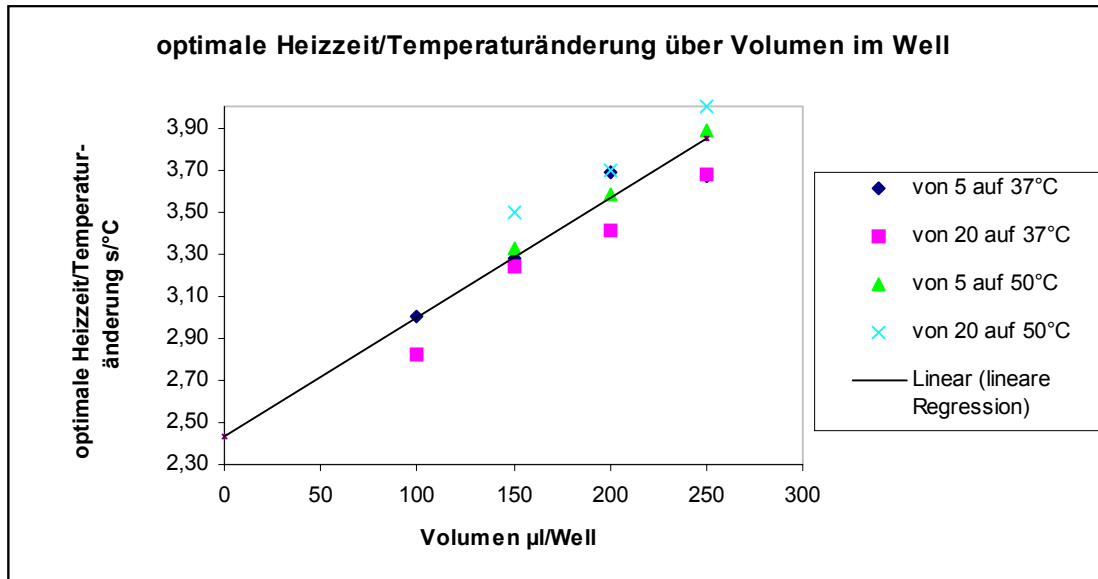


Abb. 4.1: Darstellung des Verhältnisses optimale Heizzeit/Temperaturänderung über Volumen im Well, gemessen bei verschiedenen Lösungsvolumina Aqua dest im Well und verschiedenen Start- und Solltemperaturen (Differenz=Temperaturänderung), metallische Heizkörper mit konstanter Heizleistung betrieben, Dachheizung vorgeheizt auf Solltemperatur+3°C

Die Kenntnis der Einschwingzeit ist wichtig, um später am zeitabhängigen Verlauf der Absorbanz, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz festlegen zu können, ab wann evtl. Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr auf Temperaturänderungen in der Lösung zurückzuführen sind. Die Ermittlung der Einschwingzeit erfolgte wieder in Abhängigkeit vom Lösungsvolumen im Well. An der Ordinatenachse wurde jedoch das Verhältnis aus Einschwingzeit der Lösungstemperatur und gewünschter Temperaturänderung aufgetragen. Es entsteht Abb. 4.2.

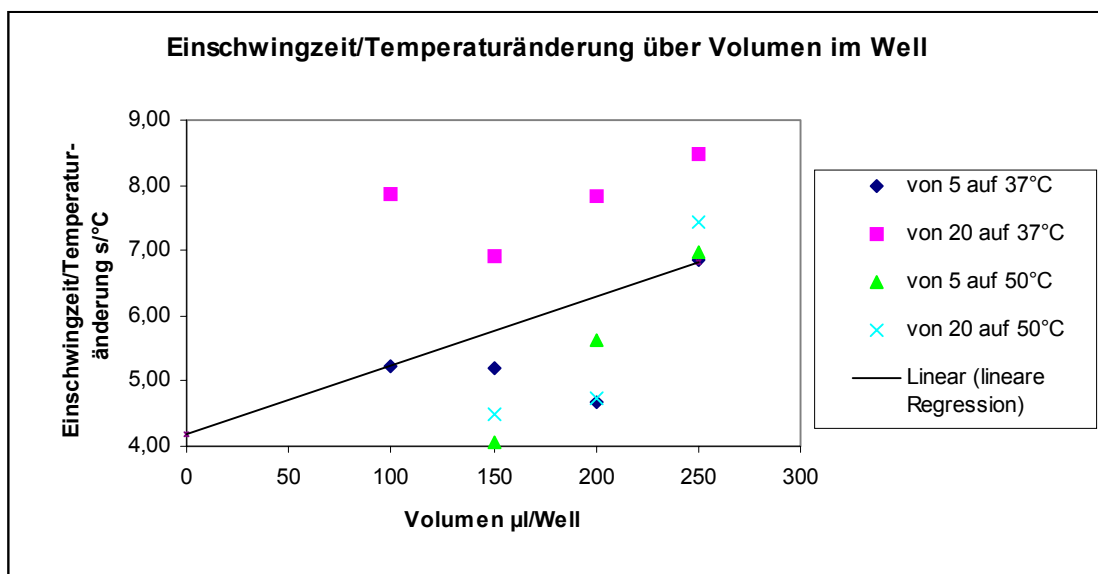


Abb. 4.2: Darstellung des Verhältnisses Einschwingzeit der Lösungstemperatur/Temperaturänderung über Volumen im Well, gemessen bei verschiedenen Lösungsvolumina Aqua dest im Well und verschiedenen Start- und Solltemperaturen (Differenz=Temperaturänderung), metallische Heizkörper mit konstanter Heizleistung betrieben, Dachheizung vorgeheizt auf Solltemperatur+3°C

Es ist zu sehen, daß die Ergebnisse deutlich stärker streuen als in Abb. 4.1.

Tabelle 4.1 zeigt die gemessene optimale Heizzeit, die mittels der Ergebnisse (4.1) berechnete optimale Heizzeit und die mit Hilfe eines Modells nach den Gleichungen (4.3) bis (4.6) berechnete optimale Heizzeit.

			optimale Heizzeit		
Temperatur ϑ	Temperatur- änderung $\Delta\vartheta$	Lösungs- volumen V	gemessen	lineare Regression	Modell
5°C → 37°C	32°C	100 µl	96 s	96.0 s	108.8 s
		150 µl	105 s	105.1 s	123.4 s
		200 µl	118 s	114.1 s	137.9 s
		250 µl	117.5 s	123.1 s	152.5 s
20°C → 37°C	17°C	100 µl	48 s	51.0 s	57.0 s
		150 µl	55 s	55.8 s	64.6 s
		200 µl	58 s	60.6 s	72.7 s
		250 µl	62.5 s	65.4 s	79.7 s
5°C → 50°C	45°C	100 µl	-	135.1 s	155.7 s
		150 µl	160 s	147.8 s	176.7 s
		200 µl	161 s	160.5 s	197.7 s
		250 µl	175.1 s	173.1 s	218.7 s
20°C → 50°C	30°C	100 µl	-	90.0 s	101.8 s
		150 µl	105 s	98.5 s	115.4 s
		200 µl	111 s	107.0 s	129.0 s
		250 µl	120 s	115.4 s	142.6 s

Tabelle 4.1: gemessene optimale Heizzeit, aus linearer Regression der gemessenen optimalen Heizzeiten berechnete optimale Heizzeit und die mittels eines Modells berechnete optimale Heizzeit in Abhängigkeit von gewünschter Temperaturänderung und Lösungsvolumen je Well. Die Daten der Spalte ‚gemessen‘ stammen aus Abb. 4.1.

Eine lineare Regression mit dem Ansatz $y=c_1+c_2 \cdot x$, wobei alle Wertepaare aus Abb. 4.1 berücksichtigt wurden, liefert die Ergebnisse

$$c_1=2.4375 \text{ s/}^\circ\text{C}, c_2=0.0056404 \text{ s/}(\text{}^\circ\text{C} \cdot \mu\text{l}) \text{ und } R=0.9161 \quad (4.1).$$

Dabei ist y das Verhältnis aus ermittelter optimaler Heizzeit und Temperaturänderung; x ist das Lösungsvolumen je Well. Die mit dieser Gleichung berechneten Heizzeiten liegen sehr nahe an den gemessenen. Die Größe c_2 wird allein durch die Wärmekapazität der Lösung bestimmt, deshalb kann aus dem Ansatz $P \cdot \Delta t = m \cdot c \cdot \Delta\vartheta$ mit der Heizzeit Δt , der Summe der Wärmekapazitäten aus Multiküvette und Lösungsvolumen in allen 96 Wells $m \cdot c$ und der erreichten Temperaturänderung $\Delta\vartheta$ mittels Umstellung nach $\Delta t / \Delta\vartheta$ und Koeffizientenvergleich

mit Ergebnis (4.1) die effektiv wirksame Heizleistung zu 77.6 W bestimmt werden. Verglichen mit der elektrisch investierten Heizleistung von

$$P_{\text{Heiz}}=87.3 \text{ W} \quad (4.2)$$

ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Das absolute Glied c_1 in Ergebnis (4.1) ergibt multipliziert mit der effektiv wirksamen Heizleistung die Wärmekapazität der Multiküvette zu 189.15 Ws/°C, was mit dem aus den Materialkenngrößen in Tabelle 3.1 ermittelten Wert von 206 Ws/°C auch gut übereinstimmt. Die mittels der linearen Regression berechneten optimalen Heizzeiten sind in Tabelle 4.1, Spalte ‚lineare Regression‘ eingetragen.

Das Modell nach den Gleichungen (4.3) bis (4.6) zur Berechnung der optimalen Heizzeiten beruht auf zwei vereinfachenden Näherungen: a) Die Übertragungsstrecke elektrische Wärmezeugung → Wärmeleitung zur Lösung → Erwärmung der Lösung im Well wird anstelle einer partiellen durch eine gewöhnliche Differentialgleichung 2. Ordnung beschrieben; b) Die Wärme findet unterschiedliche Ausbreitungswege bzgl. Aufheizen und Abkühlen vor. Da sich der Heizkörper deutlich schneller erwärmt als abkühlt, ist das System nichtlinear. Diese Nichtlinearität wird vernachlässigt.

Mit Hilfe dieser beiden Festlegungen kann das Übertragungsverhalten Lösungstemperatur zu Heizleistung $K(p)$ durch eine gewöhnliche lineare Differentialgleichung 2. Ordnung mit konstanten Koeffizienten beschrieben werden. Das elektrische Ersatzschaltbild ist ein stark gedämpfter Tiefpaß 2. Ordnung. Die Gleichung für das Übertragungsverhalten im Laplace-Bereich lautet

$$K(p) = \frac{k_s}{(1 + p \cdot \tau_1) \cdot (1 + p \cdot \tau_2)} \quad (4.3).$$

Die Parameter k_s , τ_1 und τ_2 wurden durch mehrfache Aufnahme der Sprungantwort der Lösungstemperatur mit verschiedenen Lösungsvolumina V ermittelt. Es ergaben sich folgende Zusammenhänge:

$$k_s=2.8^\circ\text{C/W} \quad (4.4),$$

$$\tau_1=30 \text{ s} + V \cdot 1 \text{ s}/30 \mu\text{l} \quad (4.5),$$

$$\tau_2=500 \text{ s} + V \cdot 2 \text{ s}/\mu\text{l} \quad (4.6),$$

Die Eigenschwingungsdauer des Systems nach Gleichung (4.3) beträgt mit den Gleichungen (4.5) und (4.6) $T_0=32\dots55 \text{ s}$, und die Dämpfung beträgt $D=7.9\dots9.2$ bei $V=0\dots250 \mu\text{l}$. Die Gleichungen (4.4) bis (4.6) wurden zur Realisierung des zeitoptimalen Aufheizens ermittelt.

Ist die Lösungstemperatur erreicht, muß sie auf diesen Wert geregelt werden. Dazu ist die Messung ihres Istwertes nötig, der jedoch aus bereits diskutierten Gründen nicht verfügbar ist. Deshalb wurde die Temperatur des Heizkörpers als Regelgröße verwendet. Eine Kennwertermittlung des Streckenübertragungsverhaltens Heizkörpertemperatur zu Heizleistung ergibt einen gedämpften Tiefpaß zweiter Ordnung analog zu Gleichung (4.3) mit den Parametern

$$k_s = 2.8^\circ\text{C/W} \quad (4.7),$$

$$\tau_1 = 2 \text{ s} + V \cdot 1 \text{ s}/250 \mu\text{l} \quad (4.8),$$

$$\tau_2 = 500 \text{ s} + V \cdot 2 \text{ s}/\mu\text{l} \quad (4.9).$$

Wegen der Abhängigkeit der Modellparameter vom Lösungsvolumen V muß dieses dem eigens in den absorbanzmessenden Reader eingebauten Temperaturregelrechner mitgeteilt werden. Der Temperaturregelrechner braucht die Parameter k_s nach Gleichung (4.7), τ_1 nach Gleichung (4.8) und τ_2 nach Gleichung (4.9) für die Temperaturregelung im eingeschwungenen Zustand und nicht zum zeitoptimalen Aufheizen. Für das Streckenübertragungsverhalten Lösungstemperatur zu Heizkörpertemperatur wurde ein Tiefpaß erster Ordnung mit den Parametern

$$k_s = 0.975 \quad (4.10)$$

$$\tau_1 = 30 \text{ s} + V \cdot 1 \text{ s}/30 \mu\text{l} \quad (4.11)$$

ermittelt. Die Gleichungen (4.10) und (4.11) versetzen den Temperaturregelrechner in die Lage, den aktuellen Wert der Lösungstemperatur mit Hilfe einer in sein Programm implementierten gewöhnliche linearen Differentialgleichung 1. Ordnung mit konstanten Koeffizienten laufend zu berechnen.

Es ist theoretisch möglich, die mittels der Gleichungen (4.10) und (4.11) berechnete Lösungstemperatur als Regelgröße zu verwenden. Sie entspricht nach Abklingen eines fehlerhaften Anfangswertes und unter Ausschluß von Störungen der tatsächlichen, nicht beobachtbaren Lösungstemperatur. Dieser Ansatz hat sich praktisch nicht bewährt. Es stellt sich kein stabiler eingeschwungener Zustand ein, weil die Stellgröße aufgrund ihrer hohen berechneten Werte ständig an ihre Grenzen stößt.

Die im Anhang I mit Hilfe des Modells nach den Gleichungen (4.3) bis (4.6) berechneten Umschaltzeiten sind genau die optimalen Heizzeiten und in Tabelle 4.1 in der Spalte ‚Modell‘ eingetragen worden. Es ist zu sehen, daß die so berechneten Heizzeiten durchweg größer als die gemessenen sind. Die Abweichungen sind mit etwa +20 % so groß, daß ein merkliches Überschwingen der Lösungstemperatur zu beobachten ist. Dieser Unterschied ist auf die Vereinfachung im Modellansatz zurückzuführen.

Tabelle 4.2 zeigt die gemessene Einschwingzeit der Lösungstemperatur, die mit dem Modell berechnete Einschwingzeit sowie die mit dem Modell berechnete Zeit, bei der noch 0.1°C zur Solltemperatur fehlen, wieder in Abhängigkeit von Lösungsvolumen und Temperaturänderung.

Der Versuch, mittels linearer Regression einen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis Einschwingzeit zu Temperaturänderung und dem Lösungsvolumen im Well herzustellen, führt nicht auf einen so gut korrelierten Zusammenhang wie in Ergebnis (4.1) gezeigt (Legende zu Tabelle 4.2). Die Ergebnisse streuen stark. Die ermittelte Einschwingzeit hängt

stark davon ab, wie genau die gewünschte Lösungstemperatur erreicht werden soll und ob sie aus einem Toleranzband überschwingen und wieder zurückkommen darf.

			Einschwingzeit		Zeit f. -0.1°C
Temperatur ϑ	Temperatur- änderung $\Delta\vartheta$	Lösungs- volumen V	gemessen	Modell	Modell
5°C → 37°C	32°C	100 µl	167 s	175.3 s	163.9 s
		150 µl	166 s	193.5 s	181.1 s
		200 µl	150 s	211.6 s	198.2 s
		250 µl	220 s	229.7 s	215.2 s
20°C → 37°C	17°C	100 µl	134 s	139.2 s	124.0 s
		150 µl	117.6 s	151.9 s	135.2 s
		200 µl	133 s	164.4 s	146.4 s
		250 µl	144 s	176.8 s	157.4 s
5°C → 50°C	45°C	100 µl	-	211.8 s	202.2 s
		150 µl	183 s	235.7 s	225.1 s
		200 µl	253 s	259.6 s	248.1 s
		250 µl	314 s	283.4 s	271.1 s
20°C → 50°C	30°C	100 µl	-	170.1 s	158.4 s
		150 µl	135 s	187.5 s	174.7 s
		200 µl	142 s	204.8 s	190.9 s
		250 µl	223 s	222.1 s	207.1 s

Tabelle 4.2: gemessene Einschwingzeit und die mittels eines Modells berechnete Einschwingzeit und Zeit bis zum Erreichen von (Solltemperatur-0.1°C) in Abhängigkeit von gewünschter Temperaturänderung und Lösungsvolumen. Lineare Regression der gemessenen Einschwingzeiten führt zu $y=0.010583 \cdot x+4.1725$ und sehr schlechtem Korrelationskoeffizient: $R=0.3753$ (Ansatz wie in Tabelle 4.1). Tabelle 4.2 wurde von Tabelle 4.1 getrennt wegen dem Umfang der Daten. Die Daten der Spalte ‚gemessen‘ stammen aus Abb. 4.2.

Grundsätzlich darf für die Einschwingzeit kein linearer Zusammenhang zum Lösungsvolumen bzw. zur Temperaturänderung erwartet werden, weil sie nicht über eine lineare Funktion mit den genannten Eingangsgrößen verbunden ist. Im Gegensatz dazu ist die optimale Heizzeit über die Energiebilanzgleichung linear mit Lösungsvolumen und Temperaturänderung verbunden, was sich in einem viel höheren Korrelationskoeffizienten widerspiegelt. Bei der Messung der Einschwingzeit wurde darauf geachtet, wann die Lösungstemperatur die Solltemperatur incl. eines geringen Toleranzbandes erreicht. Da die zeitliche Änderung der Lösungstemperatur in der Nähe der Solltemperatur gegen Null geht und der Meßwert der Lösungstemperatur von zufälligen Fehlern überlagert wird, ist der Fehler der gemessenen Einschwingzeit hoch. Die mittels Modell berechnete Einschwingzeit ist größer als die gemessene (Tabelle 4.2 Spalte Einschwingzeit ‚gemessen‘ und ‚Modell‘).

Insgesamt ist zu sehen, daß die Nachbildung des Systems Heizung-Multiküvette-Lösung durch die gewählte Differentialgleichung allein nicht genügend genau erfolgt. Die berechneten optimalen Heizzeiten und Einschwingzeiten sind zu groß.

Die einzustellende optimale Heizzeit y (Tabelle 4.1 Spalte ‚gemessen‘) kann mittels linearer Regression ($R=0.9892$, Bild nicht dargestellt) aus der berechneten optimalen Heizzeit x (Tabelle 4.1 Spalte ‚Modell‘) mit der Gleichung

$$y=0.8186 \cdot x + 2.6895 \text{ s} \quad (4.12)$$

vorausgesagt werden.

Die Einschwingzeit der Lösungstemperatur kann ebenfalls mittels des vorgestellten Modells angegeben werden. Die benötigte Einschwingzeit y (Tabelle 4.2 Spalte Einschwingzeit ‚gemessen‘) wird aus der berechneten Einschwingzeit x (Tabelle 4.2 Spalte Einschwingzeit ‚Modell‘) mittels linearer Regression ($R=0.8907$, Bild nicht dargestellt) mit der Gleichung

$$y=1.2186 \cdot x - 69.553 \text{ s} \quad (4.13)$$

berechnet. Übereinstimmend mit den großen Schwankungen der Einschwingzeit ist der Korrelationskoeffizient R auch deutlich niedriger als bei der Bestimmung der optimalen Heizzeit.

Bei Betrachtung der Tabelle 4.2 fällt auf, daß alle Einschwingzeiten bis auf eine Ausnahme größer als die geforderten höchstens 2 min sind. Es darf aber nicht übersehen werden, daß die Änderung der Lösungstemperatur zum Ende zu sehr gering ist, also eine Temperaturänderung von $\Delta\vartheta=0.1^\circ\text{C}$ schon viele Sekunden eher erreicht wird (Tabelle 4.2 Spalte ‚Zeit f. -0.1°C ‘).

Ein technisches System mit verteilten Parametern führt bei seiner mathematischen Beschreibung auf eine partielle Differentialgleichung. Das ist im vorliegenden Fall die Wärmeleitungsgleichung. Diese partielle Differentialgleichung ist durch eine gewöhnliche lineare Differentialgleichung 2. Ordnung mit konstanten Koeffizienten ersetzt worden, um ein praktikabel berechenbares Modell zu erhalten. Außerdem mußte zu diesem Zweck die Nichtlinearität in der Wärmeerzeugung vernachlässigt werden. Vergleicht man die Sprungantwort des Modells mit der Sprungantwort des Systems Heizung-Multiküvette-Lösung (Verläufe nicht dargestellt), stellt man fest, daß die System-Sprungantwort schneller steigt als die Modell-Sprungantwort selbst unter Vernachlässigung der kleineren Zeitkonstanten im Modell nach Gleichung (4.5). Das ist ein Hinweis auf die vom Modell zu hoch berechneten optimalen Heizzeiten.

Das Modell nach den Gleichungen (4.3) bis (4.6) ist gut geeignet, den Zeitgewinn durch einen eingebauten Kühler zu berechnen. Die Annahme eines Kühlers, der die Wärme im Heizkörper so schnell abbaut wie sie beim Heizen aufgebaut wird, hat zwei positive Auswirkungen: a) wird die o.g. Nichtlinearität beseitigt, d.h., das Modell ist dem modellierten System

ähnlicher als ohne Berücksichtigung eines Kühlers und b) sinkt die Einschwingzeit der Lösungstemperatur, weil man bei besserer Kühlung auch länger heizen kann. Der Wärme- fluß beim Abkühlen ist nicht mehr nur auf die Wärmeleitung zur Umgebung angewiesen. Die Wege für die Wärme werden für Aufheizen und Abkühlen gleich. Das System ist linearisiert.

	optimale Heizzeit	Einschwingzeit
ohne Kühler: $P_{\text{Kühl}}=0$	79.7 s	176.8 s
mit Kühler: $P_{\text{Kühl}}=87.3 \text{ W}$	98.6 s	121.1 s

Tabelle 4.3: optimale Heizzeit und Einschwingzeit der Lösungstemperatur mit und ohne Kühler; $P_{\text{Heiz}}=87.3 \text{ W}$ nach Gleichung (4.2), $\Delta\vartheta=17^\circ\text{C}$, $V=250 \mu\text{l}$; Die optimale Heizzeit ohne Kühler entspricht der in Tabelle 4.1 Spalte ‚Modell‘ für $\Delta\vartheta=17^\circ\text{C}$ und $V=250 \mu\text{l}$; die Einschwingzeit der Lösungstemperatur ohne Kühler entspricht der in Tabelle 4.2 Spalte ‚Einschwingzeit Modell‘ für $\Delta\vartheta=17^\circ\text{C}$ und $V=250 \mu\text{l}$. Zeiten mit dem im Text beschriebenen Modell nach den Gleichungen (4.3) bis (4.6) unter Ansatz einer zeitoptimalen Steuerung berechnet, Gleichungen (4.12) und (4.13) nicht berücksichtigt

Tabelle 4.3 zeigt den Vergleich der optimalen Heizzeit und der Einschwingzeit der Lösungstemperatur mit und ohne Kühler. Die Einschwingzeit mit Kühler liegt bei etwa 2 min, ohne Kühler bei fast 3 min. Erst der gedankliche Einsatz eines Kühlers zusätzlich zum Heizer in der Multiküvette bringt die Einschwingzeit der Lösungstemperatur in den geforderten Bereich von 1...2 min.

5.1. Zusammenfassung

Für die Untersuchung von Analysengut mit optischen Methoden werden in der Pharmaindustrie, in der Biotechnologie, in medizinischen Laboratorien und Forschungseinrichtungen zur Durchführung von Screeningverfahren häufig Mikrotiterplatten (Abk. MTP) eingesetzt. Der Begriff MTP-Reader bezeichnet ein Gerät, welches die Absorbanz oder Fluoreszenz von Lösungen in MTP messen kann. Ist in den Reader noch eine Heizung für die in der MTP befindlichen Lösungen eingebaut, handelt es sich um einen sog. temperierbaren Reader. Die Eigenschaft Temperierbarkeit erlaubt wichtige Aussagen über temperaturabhängige Eigenschaften der Lösungen.

Es werden Heizverfahren für befüllte MTP benötigt, die die Forderungen Anheizzeit 1...2 min vorzugsweise von Raumtemperatur auf 37°C sowie Homogenität und Meßunsicherheit der Lösungstemperatur von je 0.1°C über die MTP unter Beachtung einiger ökonomischer Rahmenbedingungen erfüllen. Dazu werden die drei Hauptschwerpunkte Bestimmung der Lösungstemperatur, Erwärmung mittels verschiedener Heizverfahren und Entwicklung eines geeigneten Heizregimes bearbeitet.

Die Bestimmung der Lösungstemperatur geschieht mit Hilfe eines optischen Thermometers. Es besteht aus einer Lösung mit temperaturabhängiger Absorbanz bzw. Fluoreszenz. Das optische Thermometer mit temperaturabhängiger Absorbanz hat eine Unsicherheit von 0.1°C bei 37°C, eine Variationsbreite bei Wiederholung der Kalibrierkurve von 1.1°C bei 35°C und eine Drift von -0.1°C nach 20 min. Die entsprechenden Zahlen des optischen Thermometers mit temperaturabhängiger Fluoreszenz lauten 0.15°C, 0.4°C und -0.59°C nach 15 min.

Es konnte keine Erwärmungsmethode gefunden werden, die alle in der Aufgabenstellung gestellten Forderungen umfassend erfüllt. Von den praktisch untersuchten Erwärmungsarten ist die indirekte Widerstandserwärmung zur Erfüllung der Hauptforderung am besten geeignet. Gleichwertig hierzu bis auf eine etwas schlechtere Homogenität ist die Verwendung von Temperaturstrahlern höherer Temperatur.

Die Anwendung der Heizverfahren Temperaturstrahler niedriger Temperatur, dielektrische Erwärmung, kalte Infrarot-Strahler und induktive Erwärmung ist aus jeweils anderen Gründen nicht sinnvoll.

Für die indirekte Widerstandserwärmung wurde ein Heizregime entwickelt, mit dem in möglichst kurzer Zeit die Endtemperatur erreicht wird. Es besteht aus zwei Heizphasen. In der ersten wird mit maximal möglicher Leistung geheizt, in der zweiten wird nicht geheizt, um die Forderungen optimal zu erfüllen.

5.2. abstract

Micro titer plates (MTP) are frequently used in the pharmaceutical industry, biotechnology, medical laboratories and research institutions for screening procedures in order to analyse test specimen using optical methods. The term MTP-reader describes an instrument used to measure absorbency or fluorescence of solutions within MTP. A reader with a built-in solution heating system is called incubator reader. Such a reader provides the possibility of evaluating temperature-dependent solution properties.

Heating procedures for filled MTP are needed which, taking account of economic circumstances, meet the following requirements: preheating time 1...2 minutes, preferably from room temperature to 37°C as well as homogeneity and measuring uncertainty of the solution temperature of 0.1°C across the MTP. Therefore 3 main topics have been dealt with: determination of the solution temperature, heating through different procedures and development of an applicable heating strategy.

The solution temperature is determined by an optical thermometer containing a solution with temperature-dependent absorbency or fluorescence. It has a measuring uncertainty of 0.1°C at 37°C, a variation range of 1.1°C at 35°C with repeated calibration curve and a drift of -0.1°C after 20 minutes. The corresponding figures of the optical thermometer with temperature-dependent fluorescence are: 0.15°C, 0.4°C and -0.59°C after 15 minutes.

No heating method could be found that met all the requirements completely. From all the tested heating methods the indirect resistor heating is most suitable to meet the main requirements. The use of high-temperature radiators is equivalent to this except for a little worse homogeneity.

The application of other heating methods such as low-temperature radiators, dielectric heating, cold infrared radiators or inductive heating is not recommendable due to various reasons.

A heating strategy for indirect resistor heating was developed which enables reaching the final temperature within the shortest possible time. It is divided into two phases. During the first phase the highest available power is applied to the heater whereas there is no heating process during the second phase in order to meet the requirements in the best possible way.

6. Literaturverzeichnis

- Altmann 1984: Altmann, Reiner; Brandes, Georg; Regen, Otfried; Schneider, Jürgen: Chemisch-technische Stoffwerte – eine Datensammlung; VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1984
- v. Ardenne u.a. 1988: v. Ardenne, Manfred; Musiol, Gerhard; Reball, Siegfried (Hrsg.): Effekte der Physik und ihre Anwendungen; VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1988, ISBN 3-326-00035-9
- Bleicher 1986: Bleicher, Maximilian: Halbleiteroptoelektronik; Dr. Alfred Hüthig Verlag Heidelberg 1986, Lizenzausgabe des VEB Verlag Technik Berlin
- Boon u.a. 1989: Boon, Mathilde E.; Kok, L.P.: Mikrowellenkochbuch der Pathologie: Die Kunst der mikroskopischen Darstellung; Coulomb Press Leyden, Leiden 1989, ISBN 90-71421-12-0
- Bronstein u.a. 1979: Bronstein, I.N.; Semendjajew, K.A.: Taschenbuch der Mathematik, 19., völlig überarbeitete Auflage; herausgegeben von Grosche, G. u. Ziegler, V.; Gemeinschaftsausgabe Verlag Nauka, Moskau und BSB B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig 1979
- Buß 1998: Buß, Wolfgang; Mitarbeiter im Fraunhofer-Institut Angewandte Optik und Feinmechanik, mdl. Hinweis
- Cumme 1992: Cumme, Gerhard A.: unveröffentlichte Ergebnisse 1992
- Cumme 1998: Cumme, Gerhard A.: unveröffentlichte Ergebnisse 1998
- Dopatka 1982: Dopatka, Hans-Detlef: Mikrotiterplatte: DE 32 14 317
- Föllinger 1994: Föllinger, Otto; unter Mitwirkung von Roppenecker, Günter: Optimale Regelung und Steuerung; 3., verbesserte Auflage, München, Wien: Oldenbourg 1994, ISBN 3-486-23116-2
- Gehlert u.a. 1965: Gehlert, W.; Küstner, H.; Hellwich, M.; Kästner, H. (Hrsg.): Kleine Enzyklopädie Mathematik, VEB Bibliographisches Institut Leipzig 1965, 1. Auflage
- Gross u.a. 1989: Gross, Juergen; Pufahl, Holger; Saenger, Dieter; Schaller, Karl-Heinz; Wilmes, Hugo: Inkubationseinrichtung für Mikrotitrationsplatten: DE 39 38 565
- Hansen u.a. 1996: Hansen, Anthony D. A.; Jaklevic, Joseph M.: High-speed thermal cycling system and method of use: US 55 08 197
- Hiroshi u.a. 1994: Hiroshi, Tamura; Shigenori, Tanaka: Photometer: US 53 07 144
- Hiroyuki 1995: Hiroyuki, Konno: Temperature Regulator for Microplate: JP 72 60 648
- Horn u.a. 1992: Horn, Anton; Schilling, Klaus; Müller-Hipper, Reiner; Sammler, Günther: Temperierbare Multiküvette: DE 42 17 868
- Horn u.a. 1997: Horn, Anton; Pascual, Carlos; Reinhart, Konrad; Poppitz, Elke; Bethge, Mathias; Borkowski, Annett: Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben: DE 197 39 120
- Horn u.a. 1999/1: Horn, Anton; Moore, Thomas; Kreusch, Stefan; Poppitz, Elke; Bethge, Mathias; Sammler, Günter: Verfahren und Vorrichtung zur Temperierung von Analysengut in Multiwellanalysenplatten: AZ 199 08 745.8
- Horn u.a. 1999/2: Horn, Anton; Poppitz, Elke; Cumme, Gerhard A.; Bethge, Mathias: Verfahren und Testkit zur Bestimmung der Temperatur in den Einzelgefäßen von Multiküvetten mit Fluoreszenzreadern: AZ 199 28 056.8
- Jahnke-Emde 1952: Jahnke-Emde: Tafeln höherer Funktionen; bearbeitet von Emde, Fritz unter Mitwirkung von Lösch, Friedrich; B.G. Teubner-Verlagsgesellschaft Leipzig 1952; 5. Auflage
- Kasman 1995: Kasman, David H.: Microplate heater for providing uniform heating regardless of the geometry of the microplates: US 54 59 300
- Koechner 1992: Koechner, Walter: Solid-State Laser Engineering, 3. Auflage 1992 Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York: ISBN 3-540-53756-2 Springer Verlag New York, Berlin, Heidelberg: ISBN 0-387-53756-2
- Köhler u.a. 1998: Köhler, Michael; Ermantraut, Eugen: Chipstrategien für Diagnostik und Wirkstoffentwicklung; BIOforum 21(1998), H.4, S.187-191
- Kuhn 2000: Kuhn, Jens; Mitarbeiter der Fa. Temperaturmeßtechnik Geraberg, vormals Thermometerwerk Geraberg, mdl. Auskunft

- Löffler/Petrides 1998: Löffler, Georg; Petrides, Petro E.: Biochemie und Pathobiochemie; sechste korrigierte Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1998 ISBN 3-540-64350-8
- Mansveld Beck u.a. 1989: Mansveld Beck, Hendrikus J.; van Dijk, Hans; Versteeg, Henk: Thermostatic device for sample supports: EP 03 39 710
- Müller u.a. 1996: Müller, R.; Heck, S.; Niemeyer, C.M.; Blohm, D.: PCR; Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium 44(1996), Supplement, S.143-154
- Nimtz 1990: Nimtz, Günter: Mikrowellen Einführung in Theorie und Anwendung; Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien/Zürich 1990, ISBN 3-411-03203-0
- Nittel 1984: Nittel, Alfred: Temperiereinrichtungen für Mikroküvettenanordnungen, insbesondere Mikrotitrationsplatten: DE 34 41 179
- o.V. Bedienungsanleitung für Reader 340 ATTC: Bedienungsanleitung für Reader 340 ATTC, Fa. SLT Labinstruments Ges.m.b.H., Mai 1992
- o.V. Berechnung des theoretischen isoelektrischen Punktes: http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool (Juli 1999)
- o.V. Handbuch LS50B: Perkin Elmer LS50 Lumineszenzspektrometer, Benutzerhandbuch Ausgabe 1.0 März 1991
- o.V. Hüttig 1997: Hüttig, Technische Kunststoffteile, Richtwerte, Teil 1: Teilkristalline Thermoplaste, Teil 2: Amorphe Thermoplaste und Duroplaste, Ausgabe 4.5 (1997)
- o.V. Katalog Optische Glasfilter: Schott Glaswerke, Katalog Optische Glasfilter, Geschäftsbereich Optik, Verkauf Physikalische Optik, 1988
- o.V. Operation manual absorbanzmessender Reader: iEMS Reader/Analyzer/Dispenser Operation manual v. 11.09.1992, Typ 1400; Fa. Labsystems
- o.V. Optical Filter Guide: Katalog der Andover Corporation, 1998
- o.V. Optoelektronische Halbleiterbauelemente: VEB Werk für Fernsehelektronik, VEB Funkwerk Erfurt: Optoelektronische Halbleiterbauelemente, Ausgabe 1/1978
- o.V. Oriel-Katalog: LOT Oriel GmbH, Lichtquellen 1996/1997
- o.V. Pyrovar-System: Vorläufige Bedienungsvorschrift für die digitalen Handpyrometer HPA, HPG und HPK; VEB Meßgerätewerk "Erich Weinert" Magdeburg, Kombinat Elektro-Apparatewerk "Friedrich Ebert" Berlin-Treptow, 1982
- Perrin 1965: Perrin, D.D.: Dissociation Constants Of Organic Bases In Aqueous Solution; London, Butterworths, 1965
- Philippow 1976: Philippow, Eugen (Hrsg.): Taschenbuch Elektrotechnik in sechs Bänden; VEB Verlag Technik Berlin 1976, 1. Auflage
- Poppitz 1997: Poppitz, Elke: unveröffentlichte Ergebnisse 1997
- Poppitz 1999: Poppitz, Elke: unveröffentlichte Ergebnisse 1999
- Van Praet 1996: Van Praet, Peter: Incubator for Micro Titer Plates: US 56 81 492
- Puchegger u.a. 1990: Puchegger, Karl; Atzler, Josef: Temperierkammer, insbesondere für die Temperierung des Inhalts einer Mikrotitrationsplatte: WO 91/06369
- Püschner 1964: Püschner, Herbert: Wärme durch Mikrowellen: Grundlagen, Bauelemente, Schaltungstechnik; ©N.V. Philips Gloeilampenfabrieken, Eindhoven, Niederlande, 1964 (dtsh.)
- Röhl 1975: Röhl, D.: Die biologische Wirkung von Mikrowellen: Gesundheitsgefährdung durch Rundfunk-, Fernseh- und Radarsender?; Deutsche medizinische Wochenschrift 1975 Jan. 3; 100(1), S.26-29
- Römpf 1992: Falbe, Jürgen; Rogitz, Manfred (Hrsg.): Römpf Chemie-Lexikon, 9. erweiterte und bearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1992
- Römpf 1995: CD Römpf Chemie Lexikon – Version 1.0, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag 1995
- Rudolph u.a. 1989: Rudolph, Manfred; Schaefer, Helmut: Elektrothermische Verfahren: Grundlagen, Technologien, Anwendungen; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong 1989
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York: ISBN 3-540-51064-8
Springer Verlag New York, Berlin, Heidelberg: ISBN 0-387-51064-8
- Sacchitelli u.a. 1956: Sacchitelli, G.; Sacchitelli, F.: L'Azione delle microonde radar sulla plasmalipasi e sull'amilasi serica; Folia medica, Napoli, Jg.39(1956), S.1037-1042

- Schilling u.a. 1991: Schilling, Klaus; Horn, Anton; Hoffmann-Blume, Eva: Verfahren und Testkit zur Bestimmung der Temperatur in Multiküvetten mit thermochromen Indikatorsystemen; DE 41 30 584
- Schilling 1992: Schilling, Klaus: unveröffentlichte Ergebnisse 1992
- Schilling u.a. 1993/1: Schilling, Klaus; Cumme, Gerhard A., Hoppe, Horst, Horn, Anton: Hochauflösende optische Temperaturbestimmung in Mikrotiterplatten: GIT-Labor-medicin 16(1993) H.4 S.109-110
- Schilling u.a. 1993/2: Schilling, Klaus; Cumme, Gerhard. A., Hoffmann-Blume, Eva, Horn, Anton: Multiwavelength Photometry of Thermochromic Indicator Solutions for Temperature Determination in Multicuvettes: Journal of the Clinical Chemistry, Vol.39, 1993, No.2, S.251-256
- Schilling u.a. 1995: Schilling, Klaus; Horn, Anton; Wölfel, Helmut: Vorrichtung zum Einpressen von Einweg-Mikroküvetten in einen Träger und zum Auspressen von Einweg-Mikroküvetten aus einem Träger: DE 195 01 298
- Schwarzthans 2001: Schwarzthans, Ludwig: Mitarbeiter der Fa. Gantner-electronic, mdl. Auskunft
- Verbruggen 1989: Verbruggen, Hubertus Wilhelmus: Geheizte Mikrotiterplatte: DE 39 41 168
- Wanke u.a. 1961: Wanke, Klaus; Schramm, Klaus: Stahlhärtung Fachbuch für die Wärmebehandlung von Eisenlegierungen Grundlagen - Technologie - Prüfung: VEB Verlag Technik Berlin 1961
- Weast 1974-1975: Weast, Robert C. (Editor): Handbook for Chemistry and Physics: A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data; 55.th Edition 1974-1975, ISBN 087819-454-1
- Weigand 2001: Weigand, L.: unveröffentlichte Ergebnisse 2001
- Wolfbeis u.a. 1983: Wolfbeis, Otto S.; Furlinger, Eva; Kronein, Herbert; Marsoner, Hermann: Fluorimetric Analysis: Fresenius Z. Anal. Chem. (1983) H. 314 S.119-124
- Yamamoto u.a. 1988: Yamamoto, Tomoo und vier andere: Heating System for Microplate: JP 11 80 435

Anhänge

A: Das Aktivitätsthermometer

Praktische Versuche bei der Bestimmung des VK der Enzymaktivitäten mit dem Enzym AP erbrachten folgende Ergebnisse: Pipettieren einer gleichen AP-Lösung in alle 96 Wells (Nunc-Strips im Heizkörper des absorbanzmessenden Readers) mit Hilfe des Pipettierroboters, Temperieren auf 37°C und Messen gestatten die Bestimmung der Enzymaktivität mit einem VK von 1.9% über die MTP. Die Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 37°C ergibt bei pH=8.3 eine Zunahme der Enzymaktivität um 60% [Poppitz 1999]; das entspricht einer Zunahme von 5%/°C.

Die Homogenität der mit dem optischen Thermometer ermittelten Temperaturen liegt für den absorbanzmessenden Reader bei 0.16°C. Zusammen mit den genannten 5%/°C läßt sich daraus ein VK der Enzymaktivitäten von $0.16^{\circ}\text{C} \cdot 5\%/^{\circ}\text{C} = 0.8\%$ infolge Temperaturhomogenität berechnen. In den o.g. 1.9% müssen also noch andere Fehler enthalten sein. Da andere Fehleranteile unkorreliert zur Temperaturhomogenität auftreten, läßt sich deren Anteil zu $(1.9\%)^2 - (0.8\%)^2 \approx (1.7\%)^2$ ermitteln, also war die Temperaturhomogenität in diesem Versuch nicht hauptsächlicher Verursacher des VK der Enzymaktivitäten. Er rührt im wesentlichen aus anderen Fehlern her.

Wenn der gemessene VK der Enzymaktivitäten und der aus der Homogenität der Temperaturverteilung berechnete VK der Enzymaktivitäten eng zusammenliegen, ist entweder die Temperierung viel homogener als 0.16°C erfolgt (Dann hat der VK der Enzymaktivitäten seine Ursachen in zufälligen Fehlern der Meßmethode zur Aktivitätsbestimmung.) oder die Homogenität der Enzymaktivität wird fast nur durch den Temperaturfehler bestimmt (Dann ist die Meßmethode praktisch fehlerfrei.).

Der letztere Fall läßt die Idee aufkommen, eben die Reaktionsgeschwindigkeit als Thermometer zu benutzen. Damit wird der Gedanke, die homogene Temperierung als Voraussetzung für die Bestimmung der Enzymaktivität zu fordern, umgekehrt: Die Homogenität der Temperaturverteilung wird mit Hilfe der Enzymaktivität bestimmt.

Zum Vergleich der drei optischen Thermometer Absorbanz, Fluoreszenz und Enzymaktivität werden die einzelnen Empfindlichkeiten zusammengestellt:

- Die Absorbanzfunktion S nach Gleichung (2.1) bzw. (2.2) der TRIS-Kresolrot-Lösung liefert eine Temperaturabhängigkeit von -4%/°C.
- Das Fluoreszenzverhältnis p nach Gleichung (2.4) der TRIS-HPTS-Lösung liefert eine Temperaturabhängigkeit von +2.2%/°C.
- Die Empfindlichkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der katalysierten enzymatischen Reaktion gegenüber der Temperatur beträgt +5%/°C.

Voraussetzung für das Funktionieren des Aktivitätsthermometers ist eine exakt gleiche AP-Lösung in allen Wells. Die Enzymaktivität selbst muß nicht bekannt sein. Man braucht sie erst zur absoluten Bestimmung der Temperatur. Nun ist gerade die Enzymaktivität infolge des großen und kompliziert gebauten AP-Moleküls eine kritische und empfindliche Größe und deswegen nicht so stabil wie ein optisches oder gar elektronisches Thermometer. Für die absolute Bestimmung der Lösungstemperatur ist das Aktivitätsthermometer folglich weniger geeignet. Zur Bestimmung der Temperaturhomogenität ist es aufgrund seiner gegenüber den optischen Thermometern etwas höheren Empfindlichkeit dagegen vorzuziehen. Nachteilig ist der hohe Aufwand zur Herstellung einer AP-Lösung im Vergleich zu dem zur Herstellung einer TRIS-Kresolrot-Lösung.

Der VK der Enzymaktivitäten muß unabhängig von den Ursachen einen Wert von 0.5% ergeben. Dann liegt die Homogenität der Temperatur bei 0.1°C oder besser. Besser ist sie dann, wenn auf den VK der Enzymaktivitäten noch andere Größen außer der Temperatur Einfluß ausüben. Nimmt man die derzeit verwendete Methode zur Bestimmung der Enzymaktivitäten, wird ein VK von 1.9% über die MTP erreicht. Das ist für eine Kontrolle auf eine Homogenität von 0.1°C fast das Vierfache des zulässigen Wertes von 0.5%.

Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit von $5\%/^{\circ}\text{C}$ ist nur etwa halb so groß wie der Wert aus Formel (1.1), d.h., es müssen chemische Reaktionen bekannt sein, deren Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich stärker von der Temperatur abhängen als die der mit dem Enzym AP katalysierten enzymatischen Reaktion. Mit solchen Reaktionen könnte die Auflösung eines optischen Thermometers verbessert werden. Andererseits wurde oben abgeleitet, daß der größte Teil des VK der Enzymaktivitäten nicht auf die Homogenität der Temperaturverteilung zurückzuführen ist, d.h., zunächst sind bei der derzeitigen Meßmethode der Enzymaktivität solange andere Fehlerursachen zu beseitigen, bis der VK der Aktivitäten von derzeit 1.9% nur noch geringfügig größer als das Produkt aus Homogenität der Temperaturverteilung von 0.16°C und Empfindlichkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von $+5\%/^{\circ}\text{C}$ ist. Dann muß der visuelle Vergleich der Verteilung der Aktivitätshomogenität mit der Temperaturhomogenität über die MTP eine starke Übereinstimmung ergeben. Erst dann führt eine bessere Homogenität der Temperaturverteilung zu einer weiteren Verbesserung der Aktivitätshomogenität.

Der Hauptnachteil des Aktivitätsthermometers ist die Notwendigkeit von zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelten Meßwerten. Erst aus deren Differenz ist der temperaturabhängige Reaktionsfortschritt erkennbar und daraus die über die Zeitdifferenz gemittelte(!) Lösungstemperatur berechenbar. Die Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten haben mit den zeitlich nacheinander erfolgenden Messungen bei Mehr-Wellenlängenverfahren nichts zu tun.

B: Versuch der Verbesserung der Temperaturbestimmungsgleichung bei Messung im absorbanzmessenden Reader

Die Parameter n, m, k in Gleichung (2.3) werden durch den verwendeten Algorithmus [Cumme 1992] so ermittelt, daß folgende Summe über alle I Wertepaare $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ minimal wird:

$$\sum_{i=1}^I (\ln S_i - (n + m \cdot \vartheta_i^k))^2 \longrightarrow \text{Min} \quad (\text{B1}).$$

Bei der Betrachtung der Gleichung (2.3) fällt auf, daß es keinen Parameter gibt, der es gestattet, das Bild der Gleichung in einem Koordinatensystem $\ln S$ über ϑ parallel zur ϑ -Achse zu verschieben, um eine möglichst gute Anpassung des Kurvenverlaufs an die Wertepaare $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ zu erreichen. Weiterhin ist der Ansatz (B1) so aufgebaut, daß eine Minimierung der Quadratfehlersumme $\Sigma(\Delta \ln S)^2$ eintritt. Bei Entfernung der Ausreißer nach durchgeführter Kalibrierung ermittelt der Algorithmus die Parameter n, m, k aus Gleichung (2.3) bereits so gut, daß der maximale Fehler bei 0.05°C liegt. Der maximale Fehler hängt stark von der Lage der Wertepaare $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ ab.

Im ersten Schritt wurde versucht, die beiden Aspekte Minimierungsziel und Verschieblichkeit zu verbessern. Dazu wurde zunächst das Minimierungsziel geändert. Es lautet für die folgende Betrachtung

$$\sum_{i=1}^I \left(\vartheta_i - \left(\frac{\ln S_i - n}{m} \right)^{1/k} \right)^2 \longrightarrow \text{Min} \quad (\text{B2}).$$

Die Parameter n, m, k sind jetzt stark nichtlinear vertreten. Dafür ist das Ziel –Voraussage der Temperatur ϑ bei Angabe des Absorbanzverhältnisses S nach Gleichung (2.1) oder (2.2)– bestmöglich formuliert: Die Vorgabe des gemessenen Absorbanzverhältnisses S liefert mittels Gleichung (2.3) die Temperatur ϑ bei einer minimalen Quadratfehlersumme $\Sigma(\Delta \vartheta)^2$.

Der Ansatz (B2) setzt voraus, daß die Streuung der gemessenen Temperatur ϑ_i bei allen Wertepaaren $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ gleich Null ist, die Temperaturen ϑ_i also fehlerfrei gemessen werden. Diese Bedingung kann praktisch nicht erfüllt werden. Es müßte also ein Parameterschätzverfahren für n, m, k eingesetzt werden, das zusätzlich noch die wahren Werte für die Temperaturen ϑ_i liefert, indem es die Streuung der gemessenen Temperatur ϑ_i berücksichtigt. Diese Verfahren bauen auf Modelle mit Fehlern in Variablen. Die empirische Standardabweichung der mit dem DTMS $5 \dots 60^\circ\text{C}$ gemessenen Temperaturen ist mit $s_{\text{DTMS}} \leq 0.01^\circ\text{C}$ nach Gleichung (2.13) mindestens 10 mal geringer als die Meßunsicherheit u nach Abb. 2.10 der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur. Dieses Verhältnis berechtigt

zum Ansatz (B2). Durch den Einsatz eines Modells mit Fehlern in den Variablen ist also voraussichtlich keine wesentliche Verringerung der Fehlerquadratsumme zu erwarten.

Das Minimierungsziel nach Ansatz (B2) kann mittels einer Ausgleichsrechnung erreicht werden. Dazu müssen die partiellen Ableitungen des Ansatzes (B2) nach allen drei Unbekannten, den Parametern n, m, k , gleichzeitig Null werden. Die entstehenden drei Gleichungen wurden als nichtlineares Gleichungssystem 3. Ordnung für n, m, k behandelt. Die Lösung erfolgte mit der Methode von Newton-Kantorowitsch [Bronstein u.a. 1979 S.785]. Als Startwerte sind die Ergebnisse der Minimierung des Ansatzes (B1) verwendet worden. Es ergibt sich eine nur unwesentliche Verbesserung des maximalen Temperaturfehlers von 0.05°C auf 0.04°C . Dabei wurde in der näheren Umgebung der Startwerte gesucht, so daß diese sich nur wenig ändern dürfen. Die Lösungssuche nach Ansatz (B2) in einer nahen Umgebung der Startwerte, die von einem anderen Minimierungsziel, nämlich Ansatz (B1), herühren, ist zulässig, weil die mit Ansatz (B1) ermittelten Parameter n, m, k die Gleichung (2.3) bereits gut auf die Wertepaare $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ legen.

Die Verwendung des korrekten Minimierungsziels (B2) statt des mathematisch einfacher zu behandelnden Minimierungsziels (B1) führt somit nicht zu einer wesentlichen Verringerung des maximalen Temperaturfehlers. Der derzeit verwendete Algorithmus [Cumme 1992] arbeitet erfahrungsgemäß sehr zuverlässig. Er braucht keine vom Nutzer vorzugebenden Startwerte. Aus beiden Gründen erscheint es nicht sinnvoll, das Minimierungsziel (B1) durch (B2) zu ersetzen.

Der zweite Schritt bestand in der Einführung eines vierten Parameters ϑ_0 . Dieser sichert die Verschieblichkeit der Kalibrierkurve parallel zur ϑ -Achse in einem Koordinatensystem $\ln S$ über ϑ . Die neue Gleichung der Kalibrierkurve lautet

$$\ln S = n + m \cdot (\vartheta - \vartheta_0)^k \quad (\text{B3}).$$

Das Minimierungsziel ändert sich gegenüber Ansatz (B2) in

$$\sum_{i=1}^I \left(\vartheta_i - \left(\frac{\ln S_i - n}{m} \right)^{1/k} - \vartheta_0 \right)^2 \longrightarrow \text{Min} \quad (\text{B4}).$$

Für diese Gleichung wurde zur Ermittlung der jetzt vier Parameter n, m, k, ϑ_0 wieder eine Ausgleichsrechnung angesetzt, welche wie oben durchgeführt wurde. Die Startwerte für dieses nichtlineare Gleichungssystem 4. Ordnung sind die Ergebnisse der Minimierung des Ansatzes (B2) sowie $\vartheta_0=0$. $\vartheta_0=0$ ist der Spezialfall, bei dem Gleichung (B3) in Gleichung (2.3) und Ansatz (B4) in Ansatz (B2) übergehen. Im Ergebnis einer Suche in der näheren Umgebung der Startwerte wurde der bisher erreichte maximale Temperaturfehler von 0.04°C aus Ansatz (B2) nicht weiter verringert. Die berechneten Werte für ϑ_0 lagen je nach Wahl des

Absorbanzverhältnisses nach Gleichung (2.1) oder (2.2) und der zu eliminierenden Ausreißer im Bereich von $0.01 \dots 0.06^\circ\text{C}$. Eine Suche in der weiteren Umgebung der Startwerte führte zu einer anderen Lösung: Die Parameter n, m, k aus Ansatz (B4) wurden durch die Minimierung stark geändert. Für ϑ_0 ergaben sich dabei je nach Wahl des Absorbanzverhältnisses nach den Gleichungen (2.1) oder (2.2) -4.29°C bzw. -10.29°C . Der maximale Temperaturfehler liegt dann bei 0.05°C .

Die Einführung eines vierten Parameters ϑ_0 in die Kalibrierkurve nach Gleichung (2.3), so daß Gleichung (B3) entsteht, führte somit nicht zu einer weiteren Verbesserung des maximalen Temperaturfehlers von 0.04°C . Je nachdem, ob in der näheren Umgebung der Startwerte eine Lösung gesucht wurde oder in der weiteren, bekommt der vierte Parameter ϑ_0 Werte von $0.01 \dots 0.06^\circ\text{C}$ oder deutlich größere Beträge. D.h., es gibt mehrere mögliche Lösungen (n, m, k, ϑ_0) , und eine von ihnen hat $\vartheta_0 \approx 0^\circ\text{C}$. Die Höhe des maximalen Temperaturfehlers wird kaum beeinflusst. Die Ergebnisse $\vartheta_0 \approx 0^\circ\text{C}$ bedeuten, daß schon die Startwerte der Ausgleichsrechnung sehr gut lagen, also die Einführung von ϑ_0 nicht notwendig ist.

Die Methode von Newton-Kantorowitsch arbeitete in dieser Anwendung nur instabil. Obwohl die Startwerte mit relativ $1 \cdot 10^{-6}$ sehr nahe an der Lösung $(n, m, k, \vartheta_0$ mit $\vartheta_0 = 0)$ lagen, ließ sich ein gezieltes Hinrechnen auf diese Lösung zu, wie bei einer Iteration erwartet wird, nicht feststellen. Die Kondition der aufgestellten Jacobi-Matrix der partiellen Ableitungen lag im Verlauf der Iteration zwischen $2 \cdot 10^9$ und $3 \cdot 10^{10}$ nach Frobenius bzw. zwischen $9 \cdot 10^{12}$ und 10^{16} nach Hadamard. Diese sehr großen Konditionen und das nichtgezielte Rechnen lassen darauf schließen, daß das vom Verfahren gesuchte Minimum nur schwach ausgeprägt ist. Aufgrund der großen Konditionen ist anzunehmen, daß auch akkumulierte Rundungsfehler durch endliche Mantissenlänge eine Rolle spielen.

Da also selbst mit einem idealen Minimierungsziel (B2) bzw. (B4) und einer gegenüber Gleichung (2.3) verbesserten Temperaturbestimmungsgleichung (B3) keine wesentlichen Verringerungen des maximalen Temperaturfehlers erreicht wurden, ist es weder sinnvoll, den derzeitigen Zustand mit Gleichung (2.3) und Minimierungsziel (B2) zu ändern noch ein gegenüber Newton-Kantorowitsch verbessertes Suchverfahren zu entwickeln.

Es konnte festgestellt werden, daß Ausreißer in den Wertepaaren $(\vartheta_i, S_i(\vartheta_i))$ größere maximale Temperaturfehler verursachen als die Verbesserung durch das korrekte Minimierungsziel (B2) oder durch den vierten Parameter ϑ_0 in Gleichung (B3).

C: aus der indirekten Widerstandserwärmung abgeleitete Lösungsideen

Folgende Lösungsgedanken der Aufgabe ‚schnelle homogene Temperierung‘ wurden aufgrund ihres höheren technologischen Aufwandes nicht näher untersucht, bergen jedoch prinzipielle Lösungsmöglichkeiten der Aufgabenstellung in sich:

Ein unkonventioneller Gedanke besteht im Verwenden von verschiedenen, nebeneinander liegenden Heizern; im Extremfall ist deren Zahl gleich der Well-Anzahl der MTP. Wenn in oder an jedem Well einzeln die Temperatur gemessen wird, kann auch in jedem Well einzeln die Temperatur geregelt werden. Hier muß ein endlicher thermischer Widerstand zwischen benachbarten Heizern und damit eine Verkopplung der Regelkreise angenommen werden, die zum Aufschaukeln des Gesamtsystems führen kann. Daher sind eingehende Stabilitätsuntersuchungen nötig. Der Gedanke an einen Heizkörper aus gut wärmeleitendem Material kann fallengelassen werden. Jedes Well braucht einen eigenen zugeordneten Heizkörper, der von dem des Nachbarwells thermisch möglichst gut isoliert ist. Man kann so z.B. Randeffekte ausregeln und gewünschte Temperaturprofile durch Vorgabe verschiedener Sollwerte erzeugen.

Eine weitere Möglichkeit, Wärme in einem Heizkörper zu erzeugen, ist die Anwendung der direkten Widerstandsheizung. Dazu wird er aus einem elektrisch leitenden Werkstoff ausgeführt. Von Kupfer und Aluminium sollte wegen deren sehr hohem spezifischen elektrischen Leitwert Abstand genommen werden, um die Ströme in einem sinnvollen Bereich zu halten. Der Heizkörper kann aus Graphit hergestellt werden. Mit Hilfe der Abmessungen der Multiküvette, des spezifischen elektrischen Leitwertes von Graphit, einer umzusetzenden Leistung von 100 W und Einspeisung des Stroms über die Stirnflächen lassen sich die nötigen Werte für Spannung und Strom berechnen. Es ergibt sich eine ungefährliche Spannung von ≈ 4 V und ein praktisch beherrschbarer Strom von ≈ 25 A. Der Wärmeleitwert von Graphit beträgt ein Viertel des Wertes von Aluminium.

Der Heizkörper kann auch aus leitfähigen Kunststoffen wie Polyoxymethylen (Abk. POM) und Polyamid 12 hergestellt werden. Deren spezifische elektrische Leitwerte sind mit 0.1 bzw. 1 S/m [o.V. Hüttig 1997] jedoch nicht groß genug, um mit Schutzkleinspannung heizen zu können. Es ergeben sich benötigte Spannungen, die zwar beherrschbar sind, aber die Schutzkleinspannung überschreiten. Die Wärmeleitwerte von POM und Polyamid 12 liegen in der Größenordnung eines Fünfhundertstels des Wertes von Aluminium [o.V. Hüttig 1997], d.h., mit einer Homogenisierung durch den Heizkörper im Bereich einiger Minuten kann nicht mehr gerechnet werden.

D: Grundlage der Erwärmung durch Infrarot-Strahlung

Die Erwärmung durch Infrarotstrahlung hat die Eigenschaft, die Wärme direkt im zu erwärmenden Stoff zu erzeugen. Damit wird die zeitaufwendige Wärmeleitung nicht benötigt, um die Wärme von außen in den Stoff zu bringen. Die beteiligten Wellenlängen liegen bei 1...10 μm . Die Erwärmung passiert über Absorption. Es können alle Stoffe erwärmt werden, solange sie für diese Wellenlängen nicht völlig transparent sind. Abb. D1 zeigt die wellenlängenabhängige Transmission von Wasser. Die Absorption ergibt sich aus der Subtraktion der Transmission von 1, die Reflexion wird vernachlässigt.

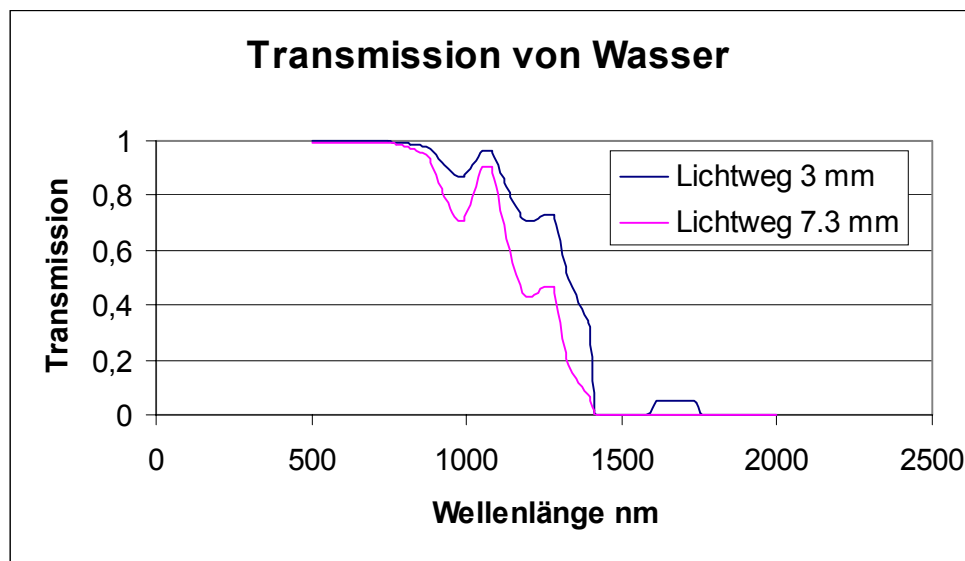


Abb. D1: Transmission von Wasser in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Der sichtbare und nahe UV-Bereich kann für die Erwärmung von Wasser nicht genutzt werden. Die Transmission nimmt unter 250 nm stark ab. Für den UV-Bereich sind keine genügend kräftigen Strahler verfügbar. Im Sichtbaren absorbiert Wasser praktisch nicht; Daten aus [Rudolph u.a. 1989 S.70] auf 7.3 mm bzw. 3 mm Lichtweg (250 μl bzw. 100 μl in Greiner F-MTP) umgerechnet. Oberhalb 2 μm ist die Transmission bei diesen beiden Lichtwegen praktisch gleich Null. Damit spielen die in der Literatur zu findenden Absorptionsmaxima dünner Wasserschichten bei etwa 1.4, 1.9, 2.9, 4.7, 6 und 14.3 μm keine Rolle.

Je mehr der Stoff absorbiert, um so effektiver wird die Strahlungsleistung für die Erwärmung verwertet. Bei extrem hoher Absorption wird nur seine Oberfläche erwärmt. Darunter liegende Volumenanteile sind vollständig auf Wärmeleitung angewiesen. Bei niedrigerer Absorption trägt der in den oberen Schichten nicht absorbierte Energieanteil zur Erwärmung der darunterliegenden Schichten bei. Die Leistungsdichte fällt in Ausbreitungsrichtung der IR-Strahlung, senkrecht von oben oder unten auf die MTP, entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz exponentiell ab. Folglich werden die Lösungsschichten an der absorbierenden Oberfläche am wärmsten. Es entsteht ein Temperaturgradient in Richtung der IR-Strahlung. Bei absorbanzmessenden Readern fällt dieser Effekt nicht ins Gewicht, da solche Reader die Absorbanz integral in Ausbreitungsrichtung der IR-Strahlung messen. Bei fluoreszenz- und chemilumineszenzmessenden Readern können aber stärkere Fehler auftreten, weil die Oberfläche überproportional am Meßsignal beteiligt ist. Zur Vermeidung dieser senkrechten Gradienten ist es möglich, die Lösung während des Aufheizens zu durch-

mischen. Dafür sind Schüttler geeignet, die neben der rotatorischen Schüttelkomponente eine vertikale aufweisen.

Temperaturstrahler sind Körper, die allein aufgrund ihrer Oberflächentemperatur T eine Strahlung mit einer gewissen Leistungsdichte abstrahlen. Die abgestrahlte Leistungsdichte ist nach dem Planckschen Strahlungsgesetz Gleichung (3.2) von der Oberflächentemperatur T und der betrachteten Wellenlänge λ abhängig. Bis zu Oberflächentemperaturen von einigen Hundert Grad Celsius wird der größte Energieanteil im Wellenlängenbereich oberhalb des für das menschliche Auge sichtbaren Bereiches abgestrahlt. Solche Temperaturstrahler erscheinen daher dunkel oder nur schwach rot, woraus sich der Begriff ‚Dunkelstrahler‘ erklärt. Oberflächentemperaturen im Bereich einiger Tausend Grad Celsius empfindet das menschliche Auge als ‚Hellstrahler‘, weil das Emissionsmaximum zu kleineren Wellenlängen verschoben ist. Die abgestrahlte Leistungsdichte hängt weiterhin vom Emissionsvermögen ε der Körperoberfläche ab. Das Emissionsvermögen ε kann wiederum selbst von der Oberflächentemperatur T und der Wellenlänge λ abhängen. Jeder Körper ist in diesem Sinne ein Temperaturstrahler. Die meisten Körper stehen mit ihrer Umgebung im thermischen Gleichgewicht und fallen so nicht durch eine abweichende Temperatur auf. Die für schnelle Erwärmung durch IR-Strahlung nötige Leistungsdichte erfordert eine Oberflächentemperatur, die deutlich höher als die Umgebungstemperatur ist.

E: Erwärmung durch kalte Infrarot-Strahlung

Es nicht notwendig, bei der Erwärmung der Lösung durch IR-Strahlung auf Temperaturstrahler zurückzugreifen. Wichtig ist nur das Vorhandensein von IR-Strahlung passender Wellenlänge auf der Lösungsoberfläche. Die Oberflächentemperatur eines Temperaturstrahlers muß in Kauf genommen werden, um IR-Strahlung entsprechend dem Planckschen Strahlungsgesetz der spektralen spezifischen Ausstrahlung Gleichung (3.2) zu erhalten. Es sind aber auch kalte IR-Strahler bekannt: Infrarotemitterdioden, Abk. IRED, und IR-Laser.

Laser gibt es für verschiedenste Wellenlängen und Leistungen. Selektiert man die bekannten Lasertypen nach den Bedingungen Dauerstrichbetrieb und Wellenlänge $\lambda \geq 1.3 \mu\text{m}$, sind die einzigen verwendbaren Typen der Halbleiter-Laser, der He-Ne-Laser, bei dem nur die höchste Wellenlänge $3.3913 \mu\text{m}$ nutzbar ist, der H_2O -Laser (27.97 und $118.59 \mu\text{m}$), der CO_2 -Laser ($10.6 \mu\text{m}$) [v. Ardenne u.a. 1988 S.559], ein Erbium:Yttrium-Lithium-Fluorid-Festkörperlaser ($\approx 2.8 \mu\text{m}$) [Koechner 1992 S.64] sowie ein Neodym:Yttrium-Lithium-Fluorid-Festkörperlaser ($1.313 \mu\text{m}$) der Firma Coherent (Deutschland) GmbH. Auf die Betrachtung leistungsstarker Impulslaser ($\approx 10^2 \dots \approx 10^8 \text{ W/Puls}$) wurde im Sinne der Schonung des Analysengutes verzichtet. He-Ne-Laser mit der Wellenlänge $3.3913 \mu\text{m}$ sowie H_2O -Laser konnten nicht gefunden werden. CO_2 -Laser sind in Leistungsklassen von 50 bis 500 W (Fa. Coherent (Deutschland) GmbH) bzw. von 35 bis 20000 W (Fa. Trumpf GmbH) kommerziell verfügbar.

Die Suche nach IRED für $1.3 \mu\text{m}$ ergab keine nutzbaren Ergebnisse. Es wurden Typen für Einkopplung der optischen Leistung in einen Lichtwellenleiter gefunden. Die eingekoppelte Leistung ist viel zu klein ($8 \mu\text{W}$ bei 50 mA Flußstrom, vgl. mit Tabelle E2). Für $1.55 \mu\text{m}$ wurden überhaupt keine IRED gefunden.

Im weiteren werden vorrangig Halbleiter-Dauerstrich-Laser für Wellenlängen zwischen 1.3 und $1.93 \mu\text{m}$ sowie CO_2 -Laser betrachtet.

Der Begriff ‚kalt‘ heißt hier, daß die IR-Strahlung nicht aufgrund der Oberflächentemperatur eines Körpers erzeugt wird. Die Erzeugung der IR-Strahlung im Halbleiter-Laser geschieht durch Ladungsträger-Rekombination im Chip. Die Wellenlänge der erzeugten IR-Strahlung ist vom Chip, also vom Typ des Halbleiter-Lasers, abhängig. Es muß eine Wellenlänge gewählt werden, bei der Wasser gut absorbiert. Abb. D1 zeigt, daß bei den betrachteten Lichtwegen von 3 und 7.3 mm im Bereich $\lambda > 1.4 \mu\text{m}$ praktisch sämtliche auftreffende IR-Strahlung absorbiert wird. Je kleiner die Wellenlänge wird, um so weniger absorbiert das Wasser. Wellenlängen unterhalb etwa 800 nm führen bei diesen Lichtwegen zur Absorption von weniger als 2% der auftreffenden Strahlung.

Für die industriell genutzten Wellenlängen 1.3, 1.48, 1.55 und 1.93 μm ist die Absorption von Wasser in Tabelle E1 dargestellt.

Absorption	Lichtweg 3 mm	Lichtweg 7.3 mm
Wellenlänge 1.3 μm	0.36	0.67
Wellenlänge 1.48 μm	0.9999	1
Wellenlänge 1.55 μm	0.9998	1
Wellenlänge 1.93 μm	1	1

Tabelle E1: Absorption von Wasser bei einem Lichtweg von 3 und 7.3 mm und bei Wellenlängen von 1.3 bis 1.93 μm ; berechnet aus der wellenlängenabhängigen Transmission von Wasser nach Abb. D1. Eine Mittelung der wellenlängenabhängigen Transmission über die Bandbreite der IR-Strahlung von IRED und von Lasern führt zum Wert in Bandmitte.

Da die Bandbreite der ausgesendeten IR-Strahlung einer IRED etwa 40 nm und die eines Lasers noch viel weniger beträgt, kann die Wellenlängenabhängigkeit der Transmission von Wasser im Bereich der Bandbreite vernachlässigt werden, obwohl die Wellenlänge $\lambda=1.3 \mu\text{m}$ auf der fallenden Flanke der Transmissionskurve (Abb. D1) liegt. Es wird mit den eben genannten Absorptionswerten gerechnet.

Tabelle E2 zeigt die für eine Aufheizgeschwindigkeit von 0.25°C/s berechnete nötige optische Leistung Φ je Well auf der Lösungsoberfläche.

optische Leistung Φ	Lichtweg 3 mm	Lichtweg 7.3 mm
Wellenlänge 1.3 μm	290 mW	379 mW
Wellenlänge 1.48, 1.55, 1.93 μm	104 mW	254 mW

Tabelle E2: berechnete nötige optische Leistung Φ je Well auf der Lösungsoberfläche bei einem Lichtweg von 3 und 7.3 mm und bei einer Wellenlänge zwischen 1.3 und 1.93 μm zum Erreichen einer Aufheizgeschwindigkeit in der Lösung von 0.25°C/s. Die Absorption von Wasser wurde aus Tabelle E1 entnommen. Die Rechnung gilt für einen einmaligen Strahldurchgang durch die Lösung (keine Reflexion des transmittierten Anteils). Es wird von der Grundgleichung der Wärmelehre $W=m \cdot c \cdot \Delta\theta$ ausgegangen. Die Energie W wird aufgelöst in $\Phi \cdot \Delta t$. Die Masse m wird aufgelöst in das Produkt $\rho \cdot V$ mit Dichte ρ und Lösungsvolumen V .

Es macht sich der Übergang von der Leistungsdichte S zur optischen Leistung Φ notwendig. Die Leistungsdichte des Strahlers ist nicht mehr überall auf der Lösungsoberfläche vorhanden wie bei den flächenhaft ausgedehnten IR-Strahlern niedriger Temperatur. Der Abstand der strahlenden Fläche eines Halbleiter-Lasers von z.B. $0.3 \cdot 0.3 \text{ mm}^2$ von der Welloberfläche ist deutlich größer als eine Seite der strahlenden Fläche, so daß bei divergentem Strahlaustritt ohne weitere Maßnahmen die quadratische Abhängigkeit der Leistungsdichte von der Entfernung wirkt. Deshalb muß die Leistung von einem oder mehreren Halbleiter-Lasern pro Well durch konstruktive Maßnahmen, z.B. Linsenarrays oder Lichtwellenleiter, gezielt auf die Welloberfläche gebracht werden. Die Übertragung der erzeugten optischen Leistung zur Lösungsoberfläche verursacht Verluste. Diese erhöhen die von den Halbleiter-

Lasern zur Verfügung zu stellende Leistung gegenüber den in Tabelle E2 berechneten Werten.

Es müssen nun genügend kräftige Halbleiter-Dauerstrich-IR-Laser gesucht werden, die bei Wellenlängen von $\lambda \geq 1.3 \mu\text{m}$ arbeiten. Die stärksten gefundenen verfügbaren mit $\lambda \geq 1.3 \mu\text{m}$ sind in Tabelle E3 zusammengestellt:

Typ	Hersteller ¹⁾	Wellenlänge	Leistung/Stück	Preis für 0.25°C/s ²⁾
C86141E	EG&G	1.3 μm	30 mW	1.6 Mio. DM
3CN00352MD	Laser 2000	1.48 μm	180 mW	0.52 Mio. DM
LFO 504	Laser 2000	1.55 μm	30 mW	0.31 Mio. DM
AOC-1930-125-HHL	Laser 2000	1.93 μm	125 mW	1.6 Mio. DM

Tabelle E3: Zusammenstellung wichtiger Daten von Halbleiter-Dauerstrich-IR-Lasern mit Wellenlängen zwischen 1.3 und 1.93 μm . Alle Typen haben Faseranschluß. ¹⁾ bzw. Händler, ²⁾ Aufheizgeschwindigkeit in allen Wells bei 7.3 mm Lichtweg

Mit den zur Verfügung stehenden optischen Leistungen läßt sich die geforderte Aufheizzeit von 1...2 min mit nur einem Halbleiter-Laser je Well nicht erreichen. Es ist aber genügend Lösungsoberfläche vorhanden, um mehrere Faseranschlüsse nebeneinander in einem Well enden zu lassen. Das Zusammenführen aller Leistungen in eine Faser ist nicht notwendig. Wahrscheinlich macht es sich jedoch erforderlich, die Faserenden der Schichtdicke im Well nachzuführen, um für verschiedene Lösungsvolumina einen gleichmäßig hohen Einkoppel-faktor zu sichern.

Die Homogenität der Temperaturverteilung hängt von der eingekoppelten Leistung ab und kann über diese beeinflusst werden. So können Randeffekte bekämpft werden. Es lassen sich alle MTP-Typen verwenden, weil die IR-Strahlung von oben in die MTP gelangen kann. Es gibt keine Forderung an den Wellquerschnitt und die Transmission des MTP-Materials. Die Transmission der verwendeten selbstklebenden Abdeckfolien Becton-Dickinson Falcon 3073 aus 25.4 μm starkem Polyester bei einigen lasertypischen Wellenlängen ist in Tabelle E4 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Folie einen großen Leistungsanteil absorbiert. Dadurch wird die schon knappe optische Leistung nochmals reduziert. Außerdem wird sich die Folie erwärmen. Letzteres könnte sich als vorteilhaft erweisen, weil so dem Beschlagen durch Verdunstung und Kondensation entgegengewirkt wird.

Lasertyp	HL-L	Nd:YLF	HL-L	HL-L	HL-L	Er:YLF	He-Ne	CO ₂
Wellenlänge	1.3 μm	1.313 μm	1.48 μm	1.55 μm	1.93 μm	$\approx 2.8 \mu\text{m}$	3.3913 μm	10.6 μm
Transmission	82 %	82 %	85 %	85 %	85 %	61 %	0.26 %	27 %

Tabelle E4: Transmission der verwendeten selbstklebenden Abdeckfolien Becton-Dickinson Falcon 3073 (Dicke: 25.4 μm , Material: Polyester) bei lasertypischen Wellenlängen; Transmissionsspektrum gemessen mit einem IR-Spektrometer System 2000 und einem Spektrometer Lambda 19; HL-L=IR-Halbleiter-Laser, Nd:YLF=Neodym:Yttrium-Lithium-Fluorid-Festkörperlaser, Er:YLF=Erbium:Yttrium-Lithium-Fluorid-Festkörperlaser, He-Ne=Helium-Neon-Gaslaser, CO₂=Kohlendioxid-Gaslaser

Schädigungen des Analysengutes können trotz der Beschränkung auf Dauerstrichlaser nicht von vornherein ausgeschlossen werden, weil bei Lasern im Unterschied zu allen anderen Erwärmungsarten die spektrale Energiedichte bei einer Wellenlänge sehr hoch ist.

Für die Regelelektronik, die Stromversorgung und die Halbleiter-Laser selbst muß Platz kalkuliert werden. Die Halbleiter-Laser können als Paket oberhalb der Erwärmungsposition der MTP untergebracht werden. Aufgrund des Faseranschlusses sowie der notwendigen kräftigen Stromversorgungen bietet es sich jedoch an, sie räumlich an eine günstige Stelle außerhalb des Readers abzusetzen. Insofern wird das Readervolumen nicht übermäßig vergrößert. Dafür ist ein beträchtliches Volumen für die abgesetzte Laserstrahlerzeugung und deren Kühlung zu kalkulieren. Vorteilhaft bei Halbleiter-Lasern ist die schnelle Verfügbarkeit der optischen Leistung: Praktisch sofort ($\tau \approx 1$ ns) nach dem Stromfluß durch das Chip ist die optische Leistung verfügbar [Bleicher 1986 S.209]. Die Verlustwärme aller Halbleiter-Laser muß abgeführt werden, ebenso wie die der zugehörigen Peltierkühler. Dies ist technisch lösbar. Das einzige wirkliche Hindernis bei der Realisierung dieser Lösung ist der voraussichtliche Preis. Der in Tabelle E3 berechnete Preis überschreitet die Vorgabe um zwei bis drei Größenordnungen. Für größere Stückzahlen wie hier kann mit einem Preisrückgang von 20 % gegenüber dem Stückpreis aus Tabelle E3 gerechnet werden.

Interessant ist auch der Gedanke an eine kundenspezifische Fertigung eines IR-Strahlers: Der muß kein Laser sein, denn gerade die lasertypischen Eigenschaften Schmalbandigkeit, Kohärenz, Leistungsdichte und die extrem hohe mögliche Modulationsfrequenz werden hier nicht gebraucht. Der hier benötigte ideale kalte IR-Strahler ist eine starke IRED.

Grundsätzlich ist auch ein CO₂-Laser als IR-Strahler brauchbar. Die kommerziell verfügbaren Typen geben genügend Leistung ab, um selbst bei gleichzeitigem Erwärmen aller Wells mit nur einem einzigen Laser die geforderte Aufheizzeit sicher zu unterschreiten. Hier kann die Frage Bewegen der MTP in beide Richtungen (zeitlich nacheinander erfolgende Erwärmung aller Wells) oder Strahlaufteilung 1 auf 96 (gleichzeitige Erwärmung aller Wells) oder eine davon abgeleitete Hybridlösung (Strahlaufteilung 1 auf 8 oder 12 Wells, Bewegen in die jeweils andere Richtung) entschieden werden, ohne daß Restriktionen bzgl. knapper optischer Leistung zu beachten sind.

Laser, abgesehen von Halbleiter-Lasern, haben eine sehr niedrige Strahldivergenz. Sie können bei entsprechender Fokussierung ihre gesamte Leistung in einer Fläche von weniger als der Oberfläche der Lösung in den Wells konzentrieren. Im Zusammenhang mit der hier betrachteten Erwärmung von Lösungen in Wells ist das eher ungünstig, denn die hohe Leistung führt am Auftreffort zu hohen Temperaturen in der Lösung. Es kommt zur Bildung eines radialen und senkrechten Temperaturgradienten und möglicherweise sogar zum Verdampfen der Lösung an der Oberfläche. Mögliche Gegenmaßnahmen sind Schütteln der MTP während des Aufheizens, gezieltes Defokussieren des Laserstrahls und Einsatz von

Lichtwellenleitern zum Transportieren der optischen Leistung. Diese tritt oberhalb der Lösungsoberfläche aus und verhindert durch den sich vergrößernden Strahldurchmesser eine zu hohe Leistungsdichte an einem einzelnen Punkt der Lösungsoberfläche.

Grundsätzlich ist jeder Typ von MTP zur Erwärmung der Wellinhalte durch IR-Strahlung eines CO₂-Lasers geeignet, weil keine weitergehenden Forderungen an die MTP gestellt werden müssen. Zu beachten ist die niedrige Transmission der Folie bei dessen Wellenlänge (Tabelle E4). Die Folie absorbiert einen wesentlichen Leistungsanteil und wird dadurch evtl. sogar irrsversibel beschädigt, was weitere Messungen bei nicht entfernter Folie stark stört. Bei der Lösung der Aufgabenstellung mit Hilfe eines CO₂-Lasers ist mit einem insgesamt deutlich größeren Readervolumen zu rechnen. Der Diamond K-200 der Firma Coherent (Deutschland) GmbH besteht in der Einbauversion aus zwei Teilen zu 61.6·11.4·30.6 und 97.8·19.9·14.7 cm³. Diese Volumina können in ein gewöhnliches Readergehäuse nicht mehr integriert werden. Es empfiehlt sich, den Laser räumlich abzusetzen. Zum Transportieren der optischen Leistung können 96 Lichtwellenleiter eingesetzt werden, die im Strahldurchmesser des Diamond K-200 von 7.0 mm zur Leistungseinkopplung gut angeordnet werden können. Der Laser wurde vom Hersteller zwar als Impuls-Laser spezifiziert, kann jedoch wegen der angegebenen Spitzenleistung von 200 W und dem hohen zulässigen Tastverhältnis der optischen Leistung von 50 % als getakteter Dauerstrichlaser betrachtet werden. Eine Schädigung des Analysengutes infolge zu hoher eingetragener Impulsleistungen kann also nicht auftreten. Eine Bereitschaftsschaltung garantiert das sofortige Erscheinen der IR-Strahlung nach einem Startsignal. Der Nachteil dieser Lösung besteht - außer im hohen erforderlichen Bauvolumen - im Preis des Lasers: Die erwähnte Einbauversion kostet 83750 DM. Das übersteigt den in der Aufgabenstellung genannten Preisrahmen deutlich.

Die Verwendung des Nd:YLF-Lasers der Firma Coherent (Deutschland) GmbH zur Lösungserwärmung muß aus finanziellen Gründen abgelehnt werden. Die technischen Parameter wie Wellenlänge, Faseranschluß, Dauerstrichbetrieb und verzögerungsfreie Leistungszuschaltung aus dem Bereitschaftsbetrieb heraus sind durchaus zur Lösung der Aufgabenstellung geeignet. Da der spezifizierte Typ nur eine Leistung von 250 mW abgibt, ist der Preis von 34 TDM netto viel zu hoch. Die abgegebene Leistung ist nach Tabelle E2 schon für ein einzelnes Well knapp. Es müssen jedoch 96 Wells erwärmt werden.

Eine Messung während des Aufheizens ist grundsätzlich vorstellbar. Erwärmungs- und Meßkanal dürfen sich nicht gegenseitig stören. Um den von der Lösung nicht absorbierten Energieanteil der Erwärmungs-Strahlungsquelle wegen Meßwertfehlern und Wärmedrift sicher vom Detektor fernzuhalten, muß die Erwärmungs-Strahlungsquelle neben dem Detektor angeordnet sein. Die Strahldurchläufe für Messung und Erwärmung müssen also entgegengesetzt gerichtet sein. Die Optik des Meßsystems ist vom Reader-Hersteller bzgl. Brennpunktlage und Glassorte für die Messung optimiert. Hier muß die Mechanik-Optik-

Konstruktion so ausgeführt werden, daß die IR-Strahlung zur Erwärmung rückwirkungsfrei in das vorhandene Meßsystem des Readers eingekoppelt werden kann. Dazu muß dieses evtl. konstruktiv geändert werden.

F: Grundlage der dielektrischen Erwärmung

Bei der dielektrischen Erwärmung wird der unsymmetrische Atombau des Wassers zur Erwärmung ausgenutzt. Der Schwerpunkt der positiven Ladungen fällt nicht mit dem Schwerpunkt der negativen Ladung zusammen. Jedes Wassermolekül hat demzufolge ein elektrisches Feld um sich. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes von außen an einen wasserhaltigen Raum drehen sich die Wassermoleküle entsprechend der Richtung des elektrischen Feldes. Diese Drehung heißt Orientierungspolarisation. Sie ist reibungsbehaftet und passiert mit einer gewissen Verzögerung. Die Verzögerung wird durch einen Tiefpaß erster Ordnung mit der Zeitkonstanten τ_m dargestellt. Die Zeitkonstante τ_m stellt die Relaxationszeit des Wassers dar. Die Reibung führt zu einer Wärmeentwicklung. Weiterhin tritt unter dem Einfluß des elektrischen Feldes die elastische und im wesentlichen reibungsfreie Verschiebungspolarisation auf. Die Verschiebungspolarisation enthält drei Komponenten: Elektronenpolarisation, Ionenpolarisation und Gitterpolarisation [Philippow 1976 Bd.1 S.558].

Das elektrische Ersatzschaltbild ergibt sich aus der Parallelschaltung zweier verlustloser Plattenkondensatoren C_I und C_{II} der Fläche A und des Plattenabstandes d mit $C_I = \epsilon_0 \cdot \epsilon_{r,I} \cdot A/d$ von der Verschiebungspolarisation und $C_{II} = \epsilon_0 \cdot \epsilon_{r,II} \cdot A/d$ von der Orientierungspolarisation. In Reihe zu C_{II} liegt der Verlustwiderstand $R = \tau_m / C_{II}$ (Abb. G1 und 3.19). Den entstehenden komplexen Leitwert schreibt man vollständig einer dadurch komplex werdenden Dielektrizität nach Gleichung (F1) zu und zerlegt ihn in Real- und Imaginärteil. Der Realteil Gleichung (F2) entspricht einem verlustlosen Kondensator, der Imaginärteil Gleichung (F3) beinhaltet die Verluste und ist deshalb für die Erwärmung verantwortlich.

$$\underline{\epsilon}_r(j \cdot \omega) = \epsilon_r'(\omega) - j \cdot \epsilon_r''(\omega) \quad (F1);$$

$$\epsilon_r'(\omega) = \epsilon_{r,I} + \frac{\epsilon_{r,II}}{1 + (\omega \cdot \tau_m)^2} \quad (F2);$$

$$\epsilon_r''(\omega) = \frac{\epsilon_{r,II} \cdot \omega \cdot \tau_m}{1 + (\omega \cdot \tau_m)^2} \quad (F3);$$

$\epsilon_{r,I}$, $\epsilon_{r,II}$ und τ_m sind temperaturabhängig [Rudolph u.a. 1989 S.90 ff.]. Die Ortskurve der komplexen Dielektrizität $\underline{\epsilon}_r(j \cdot \omega)$ ist in Abb. F1 dargestellt.

Die Stromdichte in einem Volumenelement setzt sich aus der Konvektions- und der Verschiebungsstromdichte zusammen: $\underline{J}_{ges} = \underline{J} + \underline{D}'$. Mit $\underline{J} = \kappa \cdot \underline{E}$ und $\underline{D}' = j \cdot \omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r(j \cdot \omega) \cdot \underline{E}$ bei sinusförmiger Erregung und Einsetzen von Gleichung (F1) in \underline{D}' folgt für den komplexen Leitwert $\underline{\kappa}(j \cdot \omega)$ in der Gleichung $\underline{J}_{ges} = \underline{\kappa}(j \cdot \omega) \cdot \underline{E}$:

$$\underline{\kappa}(j \cdot \omega) = \kappa + \omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r''(\omega) + j \cdot \omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r'(\omega) \quad (F4).$$

Die Leistung je Volumenelement, kurz P' , ergibt sich durch

$$P' = \underline{J}_{ges} \bullet \underline{E} \quad (F5).$$

Mit Hilfe von Gleichung (F4) folgt für P' aus Gleichung (F5)

$$P' = (\kappa + \omega \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r''(\omega)) \cdot |\underline{E}|^2 \quad (F6).$$

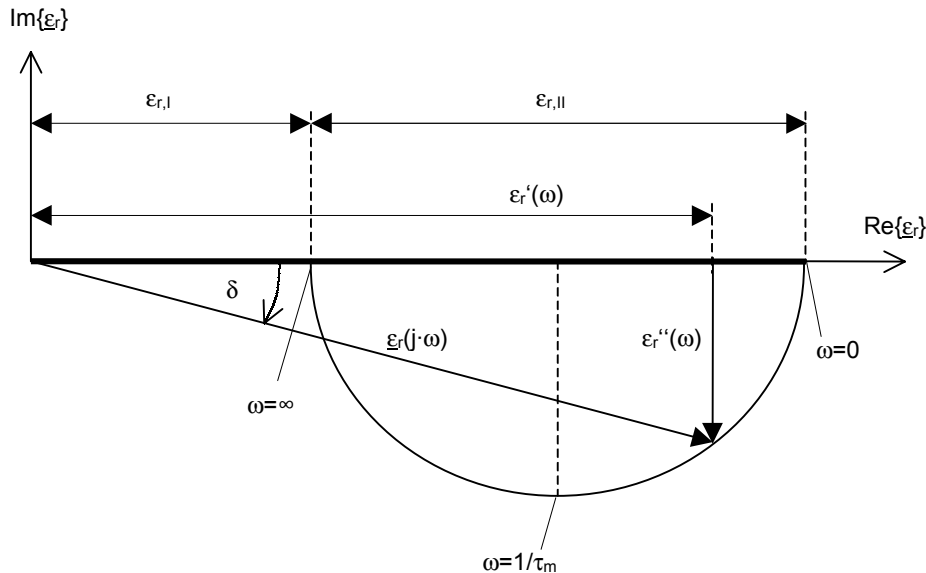


Abb. F1: Ortskurve von $\varepsilon_r(j \cdot \omega)$ nach den Gleichungen (F1), (F2) und (F3); $\varepsilon_{r,I}$ ist der Anteil der Verschiebungspolarisation; $\varepsilon_{r,II}$ ist der Anteil der Orientierungspolarisation. Der Realteil $\text{Re}\{\varepsilon_r(j \cdot \omega)\} = \varepsilon_r'(\omega)$ kennzeichnet die frequenzabhängige wirksame Kapazität. Der Imaginärteil $\text{Im}\{\varepsilon_r(j \cdot \omega)\} = \varepsilon_r''(\omega)$ ist über den Verlustwiderstand für die frequenzabhängige dielektrische Erwärmung verantwortlich. δ ist der Verlustwinkel [Rudolph u.a. 1989 S.93].

Soweit bekannt, gibt es zwei Möglichkeiten, ein elektrisches Feld an das zu erwärmende Dielektrikum zu legen: Das Dielektrikum befindet sich in einem geeigneten Kondensator oder es wird von einer elektromagnetischen Welle durchdrungen. Die erste Möglichkeit wird im Anhang G untersucht, die zweite funktioniert wie folgt:

Ein kräftiger Mikrowellengenerator, praktisch immer ein Magnetron, erzeugt eine Schwingung der Frequenz 2.45 GHz. Diese Schwingung breitet sich in Form einer Welle aus und gelangt i.a. über einen kurz gehaltenen Hohlleiter in einen Rechteckresonator. Das dort befindliche Dielektrikum wird von den Mikrowellen getroffen und durchdrungen. Die Mikrowellen regen Moleküle im Dielektrikum, die ein eigenes elektrisches Feld besitzen, zum Schwingen an. Genauer gesagt, richten sich Moleküle mit dieser Eigenschaft entsprechend der Richtung der elektrischen Feldstärke aus. Da es sich um ein Wechselfeld handelt, müssen sich die Moleküle ständig neu ausrichten und erzeugen damit Wärme durch Reibung. Der Mechanismus funktioniert für alle Moleküle mit der o.g. Eigenschaft, besonders auch für Wasser. Da Wasser der Hauptbestandteil wässriger Lösungen ist, liegt der günstige Fall vor, daß der größte Teil der Lösung zur Wärmeerzeugung beiträgt und die Temperierung somit auf keine zeitraubende Wärmeleitung in das Wasser hinein angewiesen ist.

G: Erwärmung im Kondensatorfeld

Für die Beurteilung der Lösungserwärmung in einem Kondensatorfeld werden zuerst die spezifischen elektrischen Leitwerte aller verwendeten Lösungen und danach die elektrischen Feldstärken in der Lösung bestimmt.

Die spezifischen elektrischen Leitwerte aller verwendeten Lösungen wurden bestimmt, indem zunächst ein Bezug zwischen dem spezifischen elektrischen Leitwert einer beliebigen Lösung und dem für diese Lösung vom Konduktometer 702 angezeigten Leitwert hergestellt wurde. Dazu wurde in einem quaderförmigen Trog mit rechteckförmigen Elektroden die Strom-Spannungs-Kennlinie für Gleichstrom einer NaCl-Lösung aufgenommen. Über die Abmessungen des Trogs und der Elektroden läßt sich daraus der spezifische elektrische Leitwert dieser Lösung berechnen. Von derselben Lösung wurde mit dem Konduktometer 702 der Leitwert gemessen. Das Verhältnis aus dem berechneten spezifischen elektrischen Leitwert und dem gemessenen Leitwert ist die Zellkonstante der Leitfähigkeitsmeßzelle und beträgt 76/m. Mit dieser Zahl wurden die gemessenen Leitwerte des Konduktometers 702 multipliziert und in Tabelle G1 eingetragen. Damit sind die spezifischen elektrischen Leitwerte κ der verwendeten Lösungen für das optische Thermometer und die Aktivitätsbestimmung bekannt.

spezifische elektrische Leitwerte	25°C	37°C
$\kappa_{\text{Aqua dest}}$	(0.000057...0.000084) S/m	0.00036 S/m
$\kappa_{\text{Kresolrot in TRIS}}$	0.390 S/m	0.489 S/m
$\kappa_{\text{HPTS in TRIS}}$	0.465 S/m	0.595 S/m
$\kappa_{\text{p-NPP in DEA}}$	0.588 S/m	0.740 S/m
$\kappa_{\text{4-MUP in DEA}}$	0.549 S/m	0.719 S/m

Tabelle G1: spezifische elektrische Leitwerte κ verwendeter Lösungen bei 25 und 37°C. Die verwendete Lösung für AP-Aktivitätsmessung im absorbanzmessenden Reader ist 5mM p-NPP in 1M DEA pH=9.8. Die verwendete Lösung für AP-Aktivitätsmessung im fluoreszenzmessenden Reader ist 0.5mM 4-MUP + 1 μ M Fluorescein in 1M DEA pH=9.8. Der spezifische elektrische Leitwert einer Lösung 4-MUP in DEA ändert sich von 0.514 S/m nach Zusatz eines Lösungsvolumens entsprechend einer AP-Aktivität von 0.022 U auf 0.508 S/m. Das Enzym AP ändert damit den spezifischen elektrischen Leitwert praktisch nicht und wird deshalb nicht weiter berücksichtigt.

Die Werte der Relaxationszeit τ_m und des Anteils der Orientierungspolarisation $\epsilon_{r,||}$ in Tabelle G2 wurden für 25°C aus dem Diagramm [Rudolph u.a. 1989 S.94] berechnet. Die Relaxationszeit τ_m für 37°C wurde mit Hilfe von [Püschner 1964 S.91], [Rudolph u.a. 1989 S.94] und [Weast 1974-1975 S. F-47 und F-49] ermittelt. Alle anderen Größen in Tabelle G2 wurden mit Hilfe der Gleichungen (F2) und (F3) sowie den Daten aus [Püschner 1964 S.274], teilweise mit Interpolation, ermittelt. Die Ursache der Temperaturabhängigkeit liegt nach [Rudolph u.a. 1989, S.91 u. 95] in der mit der Temperatur abnehmenden Viskosität.

Als Rechengröße für die Frequenz f wurde 27.12 MHz gewählt, weil es eine für industrielle Erwärmung verbreitete Frequenz ist. Ihr zulässiger relativer Toleranzbereich ist größer als bei anderen zur Verfügung stehenden Frequenzen.

	25°C	37°C
τ_m	12.5 ps	9.23 ps
$\omega \cdot \tau_m = 2 \cdot \pi \cdot f \cdot \tau_m$	$2.13 \cdot 10^{-3}$	$1.57 \cdot 10^{-3}$
$\epsilon_{r,I}$	12.1	18.5
$\epsilon_{r,II}$	66	56
$\epsilon_r'(\omega)$	78.1	74.5
$\epsilon_r''(\omega)$	0.141	0.088

Tabelle G2: Relaxationszeiten τ_m und Dielektrizität ϵ_r von Wasser bei 25 und 37°C, $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 27.12$ MHz

Wasser hat nach Tabelle G2 bei 25°C und 27.12 MHz eine komplexe Dielektrizität von $78.1 - j \cdot 0.141$ und bei 37°C entspr. $74.5 - j \cdot 0.088$. Das für 25°C entstehende Ersatzschaltbild ist in Abb. G1 dargestellt.

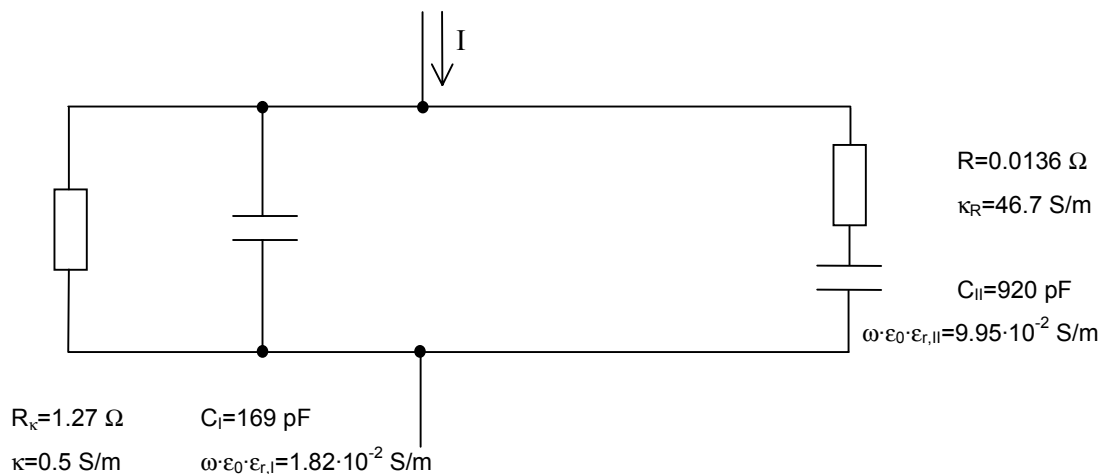


Abb. G1: Elektrisches Ersatzschaltbild der Erwärmung einer wässrigen Lösung im Kondensatorfeld mit $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 27.12$ MHz; Die Einspeisung des Stromes I steht symbolisch für das Anlegen des HF-Feldes an den Kondensator. Das Umrechnen der Werkstoffgrößen in konzentrierte Bauelemente geschieht mit folgenden Parametern: 25°C, $d = 7.3$ mm ($V = 250$ μ l in Greiner F-MTP), MTP-Grundfläche $A_{MTP} = 13.5 \cdot 8.5$ cm² ≈ 115 cm², $\kappa = 0.5$ S/m (Durchschnittswerte aus Tabelle G1), $\epsilon_{r,I}$, $\epsilon_{r,II}$, τ_m aus Tabelle G2; R_k entspricht dem Widerstand durch den spezifischen elektrischen Leitwert, C_I ist der Anteil der Verschiebungspolarisation, C_{II} der der Orientierungspolarisation; R ist der Verlustwiderstand: Mit $R = \tau_m / C_{II}$ kann κ_R berechnet werden.

Zur Beurteilung der Leitwerts-Verhältnisse wird die Serienschaltung C_{II}, R in eine jetzt frequenzabhängige Parallelschaltung C_{II}^*, R^* umgerechnet (Abb. G2). Der durch den Verlustwiderstand R^* hervorgerufene Anteil am gesamten Leitwert beträgt bei 25°C $2.12 \cdot 10^{-4}$ S/m, bei 37°C $1.27 \cdot 10^{-4}$ S/m (Rechnung nicht aufgeführt) und ist damit deutlich kleiner als die spezifischen elektrischen Leitwerte der Lösungen aus Tabelle G1. Man sieht, daß die wässrige Lösung im Kondensatorfeld fast ausschließlich vom Konvektionsstrom erwärmt wird: $R_k \ll R^*$, $\kappa \gg \kappa_R^*$. Dieser wiederum wird fast ausschließlich vom gelösten Stoff hervor-

gerufen, nicht vom Wasser selbst. Aufgrund der in dieser Anordnung hauptsächlich Erwärmung über den Konvektionsstrom ist es nicht gerechtfertigt, von einer dielektrischen Erwärmung zu sprechen. Je nach Verhältnis R_K/R^* überwiegt entweder die direkte Widerstandserwärmung oder die dielektrische Erwärmung.

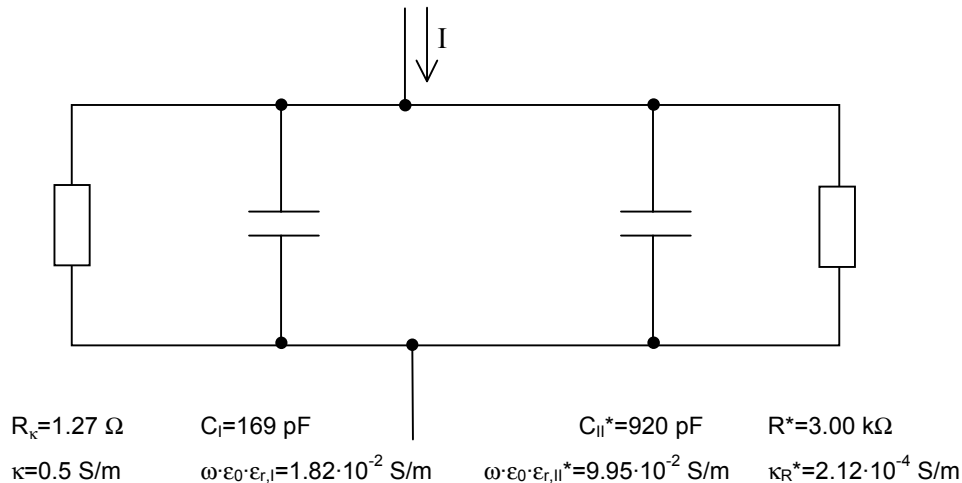


Abb. G2: Elektrisches Ersatzschaltbild der Erwärmung einer wässrigen Lösung im Kondensatorfeld mit $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 27.12 \, \text{MHz}$ und bei 25°C wie in Abb. G1, jedoch wurde wegen der Übersichtlichkeit die Reihenschaltung bestehend aus R und C_{II} in eine Parallelschaltung bestehend aus R^* und C_{II}^* umgerechnet. Sternchengrößen in dieser Abbildung sind das Ergebnis der Umwandlung einer Reihenschaltung in eine Parallelschaltung.

Unter der Voraussetzung, daß die elektrische Feldstärke $|\underline{E}_{\text{Luft}}|$ in der Luft über der Lösungsoberfläche wegen Sicherheit gegen Durchschlag den Wert von $3 \, \text{kV/cm}$ nicht überschreiten darf, kann mit $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 27.12 \, \text{MHz}$ der Spitzenwert der Stromdichte S_S höchstens

$$S_S = dD/dt = \omega \cdot \epsilon_0 \cdot |\underline{E}_{\text{Luft}}| = 45 \, \text{mA/cm}^2$$

betragen. Mit Gleichung (F6) und $S = \kappa \cdot E$ wird $P' = 0.20 \, \text{W/cm}^3$. Hier muß mit dem Leitwert $\kappa = 0.5 \, \text{S/m}$ gerechnet werden, weil er in Abb. G2 deutlich größer als κ_R^* ist. Unter Berücksichtigung der Dichte und der spezifischen Wärmekapazität von Wasser ergibt sich mit Hilfe der Grundgleichung der Wärmelehre $W = m \cdot c \cdot \Delta\vartheta$ ein erreichbarer Temperaturanstieg von 0.049°C/s . Das ist zu wenig. Eine Ursache liegt in der viel zu geringen Frequenz, die $\epsilon_r''(\omega)$ nicht auf nennenswerte Beträge kommen läßt, damit R^* in Abb. G2 deutlich kleiner als R_K werden kann. Eine weitere Ursache liegt in der geringen zur Verfügung stehenden elektrischen Feldstärke. Sie ist in der oberen zulässigen elektrischen Feldstärke $|\underline{E}_{\text{Luft}}|$ begründet. Eine Anordnung der Elektroden im Wasser sichert eine hohe elektrische Feldstärke und führt deshalb auf einen deutlich höheren Temperaturanstieg. Da in diesem Fall Luftspalt entfällt, kann auch auf das Hochfrequenzfeld verzichtet und mit Gleichstrom geheizt werden. Mit der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit $\kappa = 0.5 \, \text{S/m}$ und einer gut beherrschbaren elektrischen Feldstärke von z.B. $14.5 \, \text{V/cm}$ ergeben sich P' aus Gleichung (F5) zu $1.05 \, \text{W/cm}^3$ und die Aufheizgeschwindigkeit mit $W = m \cdot c \cdot \Delta\vartheta$ zu $\Delta\vartheta/\Delta t = 0.25^\circ\text{C/s}$.

Nach Abb. G1 wird erst bei Frequenzen

$$f > \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot C_{II} \cdot \sqrt{R \cdot (R_K - R)}} = 1.32 \text{ GHz}$$

der Anteil der dielektrischen Erwärmung größer als der Anteil durch Erwärmung mit Konvektionsstrom: Die Leistung in R überschreitet die in R_K . Insgesamt ist die Aufheizung mit Gleichstrom durchaus brauchbar. Die Aufheizgeschwindigkeit kann mit der elektrischen Feldstärke in der Lösung günstig eingestellt werden, hängt aber von der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit der Lösung ab. Während des Aufheizens kann gemessen werden, soweit die Elektroden den Lichtweg ungestört lassen oder sich während der Messung nicht im Well befinden. Randeffekte lassen sich zur Erzielung der geforderten Homogenität über die Form der Elektroden in den Randwells beeinflussen. Es lassen sich verschiedene MTP-Typen verwenden, weil der Wellquerschnitt keine bestimmte Form haben muß. Die Verwendung von Folien stößt auf die Schwierigkeit, daß die Anschlüsse für die zwei nötigen Elektroden je Well durch die Folie hindurch müssen. Das Analysengut wird durch zwei Einflüsse belastet: die beiden einzutauchenden Elektroden und der fließende Gleichstrom.

Verschmutzte Elektroden können das Analysengut negativ beeinflussen. In Lösung gehende Ionen der Elektrodenoberfläche stören den Ablauf der chemischen Reaktion im Well. Dadurch kann sich der pH-Wert der Lösung ändern. Es kann Gasentwicklung eintreten. Die Eigenschaften der Elektrodenoberfläche können sich durch die Lösung ändern.

Das elektrische Feld bewirkt den Transport elektrisch geladener Teilchen zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Das Enzym AP beispielsweise hat eine vom pH-Wert der Umgebung abhängige elektrische Ladung. Seine elektrische Neutralität liegt nach [o.V. Berechnung des theoretischen isoelektrischen Punktes] bei pH=5.72. Die Aktivität wird weit im alkalischen Bereich (pH=9.8) gemessen. Dort ist das AP-Molekül elektrisch negativ geladen und bewegt sich folglich zur Anode. Damit ist es der Katalysierung der chemischen Reaktion zumindest teilweise entzogen. Es kann auch noch völlig unwirksam werden, weil sich an den Elektroden der pH-Wert stark ändert und weil es an der Anode elektrisch neutralisiert wird. Die Erwärmung mit Gleichstrom ist wegen der elektrolytischen Wirkung auf elektrisch geladene Teilchen mit den beiden unerwünschten Nebenwirkungen Ladungsträgertransport und Elektrodeneinfluß verbunden. Übereinstimmend damit konnte kein kommerzieller Reader gefunden werden, der die Lösung im Well nach diesem Prinzip aufheizt.

Die Elektroden in jedem Well stellen ein mechanisch anfälliges Gebilde dar. Dadurch wird die Praktikabilität des Heizungssystems beeinträchtigt. Andererseits braucht es kaum zusätzliches Bauvolumen. Die Wärme beginnt sofort nach dem Einschalten direkt in der Lösung zu wirken, weil sie dort erzeugt wird. Der Preis wird in erster Linie von der Gestaltung des Elektrodenträgers beeinflusst. Es ist zu beachten, daß der Elektrodenträger gereinigt werden

muß, da er voraussichtlich kein Verschleißteil werden kann. Eine andere Lösungsmöglichkeit ist das Aufdampfen der Elektroden auf die Innenseiten der Wellwände. Damit wird die MTP zwar teurer als bisher, kann jedoch wieder als Einwegartikel behandelt werden.

Im folgenden wird die Aufheizung mit einem HF-Kondensatorfeld weiter betrachtet. Unter Berücksichtigung eines technologisch bedingten Luftspaltes von 6 mm über der Lösungsoberfläche, was bei Greiner F-MTP der Höhendifferenz zwischen MTP-Oberfläche und Flüssigkeitsoberfläche bei einem Lösungsvolumen von $V=100\text{ }\mu\text{l}$ je Well entspricht, ergibt sich dort ein Spannungsabfall von $(3\text{ kV/cm})\cdot 0.6\text{ cm} = 1800\text{ V}$ Spitzenwert. Weiterhin befindet sich zwischen der Lösungsoberfläche und der unteren Elektrode noch der MTP-Boden (PS: $|\epsilon_r|=2.5$, PP: $|\epsilon_r|=2.3$ [o.V. Hüttig 1997]), was hier nicht berücksichtigt wird. Man kann den Boden der MTP wie einen um den Faktor $|\epsilon_r|$ dünneren Luftspalt behandeln, $\tan(\delta)$ ist dann etwas anders. Die Kapazität des Luftspaltes zwischen Lösungsoberfläche und oberer Elektrode beträgt 17 pF ($X_C=346\text{ }\Omega$). Es fließt ein Spitzenstrom von etwa $1800\text{ V}/346\text{ }\Omega=5.2\text{ A}$. Die Last ist fast eine reine Blindlast. Ihr Realteil ergibt sich, wenn die Reihenschaltung aus Luftspalt und elektrischem Ersatzschaltbild nach Abb. G2 in eine Reihenschaltung aus einem reellen und einem Blindwiderstand umgerechnet wird: $Z_L=(1.20-j\cdot 346)\text{ }\Omega$. Die benötigte Wirkleistung beträgt nur $(5.2\text{ A}/\sqrt{2})^2\cdot 1.20\text{ }\Omega=16.3\text{ W}$. Es liegt nahe, an dieser Stelle einen Serienresonanzkreis einzusetzen. Dann muß die hohe Spannung von $2\cdot 1800\text{ V}$ nicht von einem HF-Generator bereitgestellt werden. Die Kreisgüte kann wegen der benötigten Induktivität nicht auf dem Wert $346\text{ }\Omega/1.20\text{ }\Omega=288$ gehalten werden. Die notwendige Wirkleistung steigt, ist jedoch beherrschbar. Es muß beachtet werden, daß die Kapazität des Luftspaltes vom Füllstand abhängt. Für eine möglichst schnelle Erwärmung muß an der Grenze zur Durchschlagfeldstärke gearbeitet werden. Der Elektrodenabstand muß somit dem Füllstand folgen. Bei den eben durchgeführten Berechnungen wurde vereinfachend vorausgesetzt, daß nicht eine MTP mit 96 Wells, sondern eine Wanne mit einer homogenen Lösungsoberfläche als Dielektrikum dient.

Weiterhin ist zu bemerken, daß Anlagen zur Hochfrequenzerwärmung einen deutlichen technischen Aufwand erfordern. Die gestellten Forderungen an Platz und Preis sind voraussichtlich nicht erfüllbar. Vorteilhaft wirken sich die Freiheiten in der Gestaltung der Elektrodenform aus, womit sich Randeffekte bekämpfen lassen. Aufgrund der Erwärmungswirkung über den Konvektionsstrom ist die Erwärmungsgeschwindigkeit vom spezifischen elektrischen Leitwert der Lösung abhängig. Aus den genannten Gründen wurde auf eine weitere Untersuchung des Lösungsansatzes Kondensatorfeld verzichtet.

H: Induktive Erwärmung

Entsprechend dem 2. Maxwell'schen Gesetz führt die zeitliche Änderung einer magnetischen Flußdichte zur Entstehung einer elektrischen Feldstärke:

$$\text{rot } \underline{E} = - \underline{B}' \quad (\text{H1}).$$

Die elektrische Feldstärke \underline{E} erzeugt eine Stromdichte $\underline{J} = \kappa \cdot \underline{E}$. Durchsetzt die magnetische Flußdichte \underline{B} einen Körper mit einem spezifischen elektrischen Leitwert $\kappa > 0$, so fließen im Körper Ströme, die Joulesche Wärme erzeugen. Dieser Effekt ist als induktive Erwärmung bekannt.

Die Stärke der induktiven Erwärmung nimmt bei gegebener magnetischer Feldstärke \underline{H} mit folgenden drei Parametern zu:

- Kreisfrequenz ω (sinusförmige Erregung betrachtet): Die elektrische Feldstärke \underline{E} steigt nach Gleichung (H1) mit der zeitlichen Ableitung der magnetischen Flußdichte \underline{B} .
- spezifischer elektrischer Leitwert κ : Die Stromdichte $\underline{J} = \kappa \cdot \underline{E}$ steigt bei gleicher elektrischer Feldstärke \underline{E} .
- relative Permeabilität μ_r : Die magnetische Flußdichte $\underline{B} = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \underline{H}$ steigt bei gleicher magnetischer Feldstärke \underline{H} .

Von diesen drei Parametern ist nur die Kreisfrequenz ω wählbar. Die beiden anderen liegen infolge der Materialeigenschaften des zu erwärmenden Körpers fest.

Es wird die direkte Erwärmung einer Lösung betrachtet, d.h., die Wärme entsteht in der Lösung selbst. Damit ist man von der Form des Wells unabhängig und kann jeden MTP-Typ einsetzen. In diesem Fall ist eine wäßrige Lösung zu erwärmen, die die Parameter $\kappa = 0.5 \text{ S/m}$ (Tabelle G1) und $\mu_r = 1$ hat. Als Rechenwerte für die Frequenz werden 27.12 MHz und 2.45 GHz gewählt. Diese gegenüber industriellen Anlagen zur induktiven Erwärmung elektrisch gut leitender Körper sehr hoch gegriffenen Frequenzen sind wegen der hier vorhandenen vergleichsweise niedrigen Parameter κ und μ_r berechtigt. Tabelle H1 zeigt die Eindringtiefe einer elektromagnetischen Welle in Aqua dest und in eine Lösung.

Eindringtiefen	$\omega = 2 \cdot \pi \cdot 27.12 \text{ MHz}$	$\omega = 2 \cdot \pi \cdot 2.45 \text{ GHz}$
Verschiebungsanteile	$\omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r''(\omega) = 1.33 \cdot 10^{-4} \text{ S/m}$	$\omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r''(\omega) = 1.06 \text{ S/m}$
Aqua dest $\kappa = 10^{-4} \text{ S/m}$	9.67 m	1.02 m
Lösung $\kappa = 0.5 \text{ S/m}$	0.137 m	0.014 m

Tabelle H1: Eindringtiefen einer elektromagnetischen Welle, die senkrecht auf einen quaderförmigen unendlich ausgedehnten Körper trifft; berechnet nach $\sqrt{2/(\omega \cdot \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \kappa)}$, $\mu_r = 1$, $\epsilon_r''(2 \cdot \pi \cdot 27.12 \text{ MHz}) = 0.088$ (Tabelle G2), $\epsilon_r''(2 \cdot \pi \cdot 2.45 \text{ GHz}) = 7.8$ (Tabelle 3.13). Nur im Fall $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 27.12 \text{ MHz}$ und $\kappa = 0.5 \text{ S/m}$ können nach Gleichung (F4) die Anteile dielektrischer Erwärmung vernachlässigt werden: $\omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r''(\omega) < \kappa$.

Die Berechnung der Eindringtiefen zeigt, daß elektromagnetische Wellen nur schwach absorbiert werden. Die Eindringtiefen sind selbst bei den gewählten hohen Frequenzen relativ groß im Verhältnis zu den Abmessungen des Wells. Eine im Verhältnis zu den Well-

abmessungen große Eindringtiefe bewirkt praktisch keine Energieabsorption, so daß kaum eine Erwärmung zustande kommt. Eine kleine Eindringtiefe bewirkt die Energieabsorption am Rand des Wells, so daß zur Erwärmung der inneren Volumenanteile noch die Wärmeleitung einsetzen muß.

Die spezifische elektrische Leitfähigkeit κ der Lösung wird durch die Ionen des gelösten Stoffes hervorgerufen. Damit ihre zur Wärmeerzeugung führende Driftbewegung im elektrischen Feld zustandekommt, müssen sie der elektrischen Feldstärke \underline{E} zeitlich folgen können. Daraus folgt, daß die Frequenz bei der induktiven Erwärmung von Lösungen nicht zu hoch gewählt werden darf.

Die große Eindringtiefe und die nach oben begrenzte Frequenz zeigen, daß elektrisch leitende Lösungen und erst recht Aqua dest für die induktive Erwärmung eher ungeeignet sind.

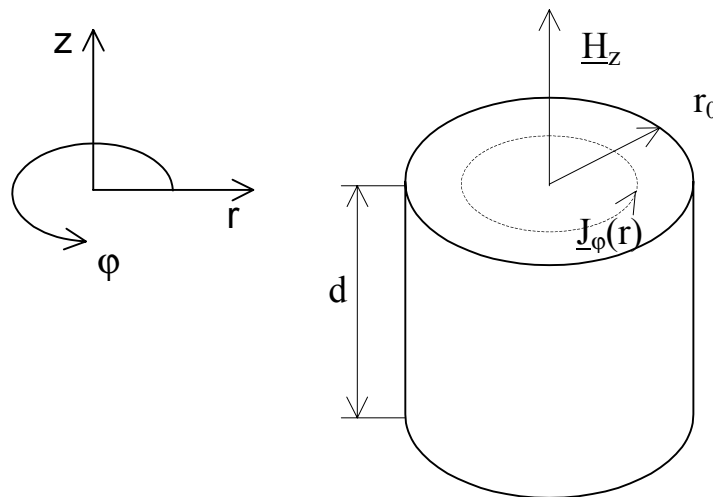


Abb. H1: Wirkungsmechanismus der induktiven Erwärmung der Lösung in einem Well einer Greiner F-MTP. Die reale Form des Wells wurde durch einen Zylinder mit dem mittleren Wellradius $r_0=3.25$ mm und der Schichtdicke $d=7.3$ mm bei $V=250$ μ l angenähert. Die magnetische Feldstärke \underline{H}_z durchsetzt die Lösungsoberfläche senkrecht und erzeugt nach Gleichung (H1) eine elektrische Feldstärke $\underline{E}_\varphi(r)$ und damit einen Konvektionsstrom $\underline{J}_\varphi(r)$.

In Abb. H1 ist der Wirkungsmechanismus der induktiven Erwärmung in einem Well dargestellt. Zur Berechnung der für die gewünschte Erwärmungsgeschwindigkeit erforderlichen Feldgrößen ist es nötig, die elektrische Feldstärke $\underline{E}_\varphi(r)$ zu ermitteln. Dazu wird die Stärke der Stromverdrängung durch den Skineneffekt berechnet. Es wird Abb. H1 zugrunde gelegt. Es gilt das 1. Maxwell'sche Gesetz

$$\underline{J}_\varphi(r) = \text{rot } \underline{H}_z \quad (\text{H2})$$

und entsprechend Gleichung (H1)

$$\text{rot } \underline{E}_\varphi(r) = - \underline{B}_z' \quad (\text{H3}).$$

In Gleichung (H3) werden die Materialgleichungen $\underline{B}_z' = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \underline{H}_z'$ und $\underline{E}_\varphi(r) = \underline{J}_\varphi(r) / \kappa$ eingesetzt. Danach wird Gleichung (H2) in Gleichung (H3) eingesetzt. Es entsteht die Differentialgleichung

$$- \text{rot rot } \underline{H}_z = \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \underline{H}_z'.$$

Bei sinusförmiger Erregung wird daraus

$$-\operatorname{rot} \operatorname{rot} \underline{H}_z = j \cdot \omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \underline{H}_z.$$

Unter Voraussetzung der Quellenfreiheit für $\underline{J}_\varphi(r)$, also $\operatorname{div} \underline{J}_\varphi(r)=0$, und mit Einsatz des Laplace-Operators Δ folgt

$$\Delta \underline{H}_z = j \cdot \omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \underline{H}_z \quad (\text{H4}).$$

Die Differentialgleichung (H4) ist vom gleichen Typ wie die, welche in [Philippow 1976 Band 1 S.172] für die Stromverdrängung in einem stromdurchflossenen Leiter hergeleitet wurde. Da hier ebenfalls ein rotationssymmetrisches Problem vorliegt, müssen auch die Lösungen beider Probleme übereinstimmen. Damit ergibt sich für die Ortsabhängigkeit der magnetischen Feldstärke \underline{H}_z die Funktion

$$\underline{H}_z(r) = H_0 \cdot \left| J_0(r \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j}) \right| \cdot e^{j\varphi_0} \quad (\text{H5}).$$

Dabei ist H_0 eine Integrationskonstante, $|J_0(r \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j})|$ der Betrag der Besselfunktion J_0 mit komplexem Argument an der Stelle $r \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j}$ und φ_0 der dazugehörige Phasenwinkel. Bei den kleinen Argumenten nach Tabelle H2 ist $\varphi_0 \approx 0$ [Jahnke-Emde 1952 S.258].

Tabelle H2 zeigt die zu J_0 gehörigen Argumente und Funktionswerte.

	$r_0 \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r}$	$\operatorname{Re}\{J_0(r_0 \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j})\}$	$\operatorname{Im}\{J_0(r_0 \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j})\}$	$ J_0(r_0 \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j}) $
$\omega = 2 \cdot \pi \cdot 27.12 \text{ MHz}$	0.034	1	-0.00029	$1 + 4.2 \cdot 10^{-8}$
$\omega = 2 \cdot \pi \cdot 2.45 \text{ GHz}$	0.32	0.9998	-0.0256	1.00013

Tabelle H2: Komplexe Argumente und Funktionswerte der Besselfunktion J_0 bei den Parametern $\kappa=0.5 \text{ S/m}$, $\mu_r=1$, $r_0=3.25 \text{ mm}$ und den Frequenzen 27.12 MHz und 2.45 GHz. Die Real- und Imaginärteile von J_0 stammen aus [Jahnke-Emde 1952 S.242f.].

Es ist deutlich zu erkennen, daß der Betrag der Besselfunktion am Rand des Wells bei beiden Frequenzen nur ganz unwesentlich über 1 liegt, d.h., die Argumente sind so klein, daß der gekrümmte Verlauf der Besselfunktion noch gar nicht zur Wirkung kommt. Also ist die magnetische Feldstärke \underline{H}_z über den Radius r praktisch konstant. Damit gibt es bei der induktiven Erwärmung von Aqua dest und elektrisch leitenden Lösungen mit $\kappa=0.5 \text{ S/m}$ keinen Skineffekt.

Die Stromdichte $\underline{J}_\varphi(r)$ ergibt sich durch Auflösen von Gleichung (H2) unter Beachtung der Zylinderkoordinaten zu $\underline{J}_\varphi(r) = -\partial \underline{H}_z / \partial r$ [Bronstein u.a. 1979 S.626] und somit durch Ableiten von Gleichung (H5) zu

$$\underline{J}_\varphi(r) = H_0 \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \left| J_1(r \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j}) \right| \cdot e^{j(\varphi_1 + \pi/4)} \quad (\text{H6});$$

φ_1 ist der Phasenwinkel der Besselfunktion J_1 mit komplexem Argument an der Stelle $r \cdot \sqrt{\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r} \cdot \sqrt{j}$. Bei den kleinen Argumenten nach Tabelle H2 ist $\varphi_1 \approx \pi/4$ [Jahnke-Emde 1952 S.258]. Die $\pi/4$ stammen von der inneren Ableitung \sqrt{j} . Die Minuszeichen von $\underline{J}_\varphi(r) = -\partial \underline{H}_z / \partial r$ und von $J_0' = -J_1$ heben sich auf.

In Gleichung (H6) treten dieselben kleinen Argumente wie in Gleichung (H5) auf. Da die Besselfunktion J_1 bis zum Argument $r \cdot \sqrt{(\omega \cdot \kappa \cdot \mu_0 \cdot \mu_r)} = 1$ noch gut als Gerade darstellbar ist [Jahnke-Emde 1952 S.240], ist der Stromdichteverlauf $\underline{j}_\varphi(r)$ praktisch nicht gekrümmt. Die Stromdichte verläuft über den Radius wie eine Gerade durch den Ursprung.

Bei örtlich konstanter magnetischer Feldstärke und örtlich linear verlaufender Stromdichte kann die elektrische Feldstärke $\underline{E}_\varphi(r)$ elementar bestimmt werden: Das 2. Maxwellsche Gesetz lautet in Integralform

$$\oint \underline{E} \, d\underline{s} = -\Phi'.$$

Die beim Radius r wirksame elektrische Feldstärke $\underline{E}_\varphi(r)$ ergibt über den Umfang $2 \cdot \pi \cdot r$ integriert eine Spannung. Diese entspricht gerade der negativen zeitlichen Ableitung des bei diesem Radius r umfaßten Flusses Φ , also gilt

$$E_\varphi(r) \cdot 2 \cdot \pi \cdot r = -\Phi' \cdot \pi \cdot r^2 / (\pi \cdot r_0^2).$$

Die Umstellung nach $E_\varphi(r)$ liefert

$$E_\varphi(r) = \frac{-\Phi' \cdot r}{2 \cdot \pi \cdot r_0^2} \quad (H7).$$

Mit der in Gleichung (H7) ermittelten elektrische Feldstärke $E_\varphi(r)$ kann die in einem Well wirksame Leistung berechnet werden.

Aus Gleichung (F5) folgt unter Verwendung von $\underline{j} = \kappa \cdot \underline{E}$ die Leistung je Volumenelement $P' = E_\varphi^2(r) \cdot \kappa$. Das Integrieren in Zylinderkoordinaten nach Abb. H1 führt auf

$$P = \kappa \cdot \int_0^{r_0} E_\varphi^2(r) \cdot r \cdot dr \cdot \int_0^{2\pi} d\varphi \cdot \int_0^d dz \quad (H8).$$

In Gleichung (H8) wird Gleichung (H7) eingesetzt. Das Ausrechnen der rechten Seite von Gleichung (H8) liefert dann

$$P = \frac{\kappa \cdot \Phi'^2 \cdot d}{8 \cdot \pi} \quad (H9).$$

Für eine gewünschte Erwärmungsgeschwindigkeit von $\Delta\vartheta/\Delta t = 0.25^\circ\text{C/s}$ sind nach der Grundgleichung der Wärmelehre im Volumen von 250 μl mit $m = 0.25 \text{ g}$ und $c = 1 \text{ cal/(g} \cdot ^\circ\text{C)}$ 0.26 W umzusetzen. Daraus ergibt sich mit Schichtdicke $d = 7.3 \text{ mm}$ der Wert Φ'^2 in Gleichung (H9) zu 1790 V^2 . Dieser Wert ist wegen der Quadrierung und der sinusförmigen Erregung der Mittelwert, also ist $\Phi_S'^2 = 3580 \text{ V}^2$ und damit

$$\Phi_S' = 59.8 \text{ V} \quad (H10).$$

Das Ergebnis (H10) stellt den Spitzenwert der zeitlichen Ableitung desjenigen Flusses Φ dar, der 250 μl Lösung mit $\kappa = 0.5 \text{ S/m}$ in einem Well nach Abb. H1 mit 0.25°C/s erwärmen kann. Nicht berücksichtigt wurde bei dieser Betrachtung, daß die spezifische elektrische Leitfähig-

keit κ der Lösung mit der Temperatur steigt (Tabelle G1). Die umgesetzte Leistung ist also nicht konstant, sondern steigt nach Gleichung (H9) ebenfalls. Dadurch verringert sich die Aufheizzeit gegenüber dem Fall temperaturunabhängiger spezifischer elektrischer Leitfähigkeit.

Mit Hilfe des Ergebnisses (H10) wird das von der Erwärmungseinrichtung, vorzugsweise eine Spule, zu liefernde Produkt $H_S \cdot \omega$ berechnet (H_S : Spitzenwert der erforderlichen magnetischen Feldstärke, Index z nicht mitgeschrieben):

Mit $\Phi = B \cdot A$ und sinusförmiger Erregung folgt $\Phi_S' = B \cdot A \cdot \omega$ und mit $B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H$ und Auflösen nach $H_S \cdot \omega$ wird

$$H_S \cdot \omega = \frac{\Phi_S'}{\mu_0 \cdot \mu_r \cdot A} \quad (H11).$$

Das Einsetzen der Zahlenwerte $\mu_r = 1$, $A = \pi \cdot r_0^2 = 33.2 \text{ mm}^2$ und Ergebnis (H10) in die Gleichung (H11) ergibt das von der Spule zu liefernde Produkt

$$H_S \cdot \omega = 1.42 \cdot 10^{12} \text{ A/(m} \cdot \text{s)} \quad (H12).$$

Im weiteren werden die Abmessungen der Spulen unter Vorgabe der geforderten Homogenität ermittelt.

Die magnetische Feldstärke H einer Spule oder einer Spulenanordnung ist ortsabhängig. Zur Realisierung der geforderten Homogenität der Temperaturverteilung über die MTP muß sie aber sehr homogen verteilt sein. Es ist also eine Spule oder eine Spulenanordnung gesucht, die bei möglichst kleinen Außenabmessungen in ihrem Inneren die nötige Homogenität liefert. Außerhalb einer solchen Anordnung ist voraussichtlich kein genügend homogenes Feld erreichbar. Die gewünschte Homogenität der Temperaturverteilung ist 0.1°C . Die gewünschte Temperaturerhöhung sei 15°C . Damit ist eine relative Homogenität von 0.67 % gefordert, die sich nochmals halbiert, weil die magnetische Feldstärke H über B , Φ und Gleichung (H9) quadratisch eingeht.

Alle Komponenten der magnetischen Feldstärke H sind an der Erwärmung beteiligt. Deshalb ist es möglich, die Homogenität der Verteilung des Betrages der magnetischen Feldstärke H zur Bestimmung der Homogenität der Temperaturverteilung zu verwenden.

Die magnetische Feldstärke H an einem beliebigen Ort wird mit Hilfe des Gesetzes von Biot-Savart berechnet. Abb. H2 zeigt die so ermittelte nötige Spulenlänge, die bei gegebenem Spulenradius eine Homogenität der Feldverteilung von 0.33 % sichert, berechnet für Spulen mit wählbarem Länge-Radius-Verhältnis und für Helmholtzspulen. Aufgrund der MTP-Abmessung kann ein gewisser minimaler Spulenradius nicht unterschritten werden. Dieser erfordert eine gewisse Spulenlänge, um die Homogenitätsforderung zu erfüllen. Bei einem kleinen Spulenradius entsteht eine lange Spule ($l \gg r$). Erhöht man den Spulenradius, muß man zur Wahrung der Homogenität zunächst auch die Spulenlänge erhöhen. Ist der Spulen-

radius hinreichend groß, befindet sich die MTP schon im ‚Fernfeld‘ der stromführenden Weg-elemente der Spule, und die erforderliche Spulenlänge sinkt. Bei einem großen Spulenradius entsteht also eine kurze Spule ($l < r$). Ab einem bestimmten Spulenradius genügt eine Spulenlänge von Null. Grundsätzlich erfüllen alle Zylinderspulen die Homogenitätsforderung, wenn sie bei gegebenem Spulenradius eine Länge aufweisen, die oberhalb der Kurven in Abb. H2 liegt. Die Homogenität wird dann besser, ebenso wie bei Verwendung von Spulen-radien, die größer sind als der für eine Länge von Null erforderliche Radius, also rechts der Kurven in Abb. H2 liegen.

Die Querlage der MTP in der Spule gestattet bei gleichem vorgegebenen Spulenradius eine geringere Spulenlänge. Das läßt sich dadurch erklären, daß bei der Querlage die Ecken der MTP nicht so weit von der Spule weg liegen wie bei Längslage. Insofern sollte bei der konstruktiven Auslegung einer solchen Spulenanordnung die MTP-Querlage vorgezogen werden. Man kommt dann mit einem Spulenradius von 5 cm und einer Spulenlänge von 45.5 cm aus.

Eine weitere mögliche Spulenanordnung sind Helmholtzspulen. Sie gestatten zwar eine deutlich geringere Spulenlänge als 45.5 cm, erfordern jedoch einen beträchtlich größeren Spulenradius als 5 cm. Die Spulenlänge in Abb. H2 entspricht dem Abstand beider Helm-holtz-Spulen.

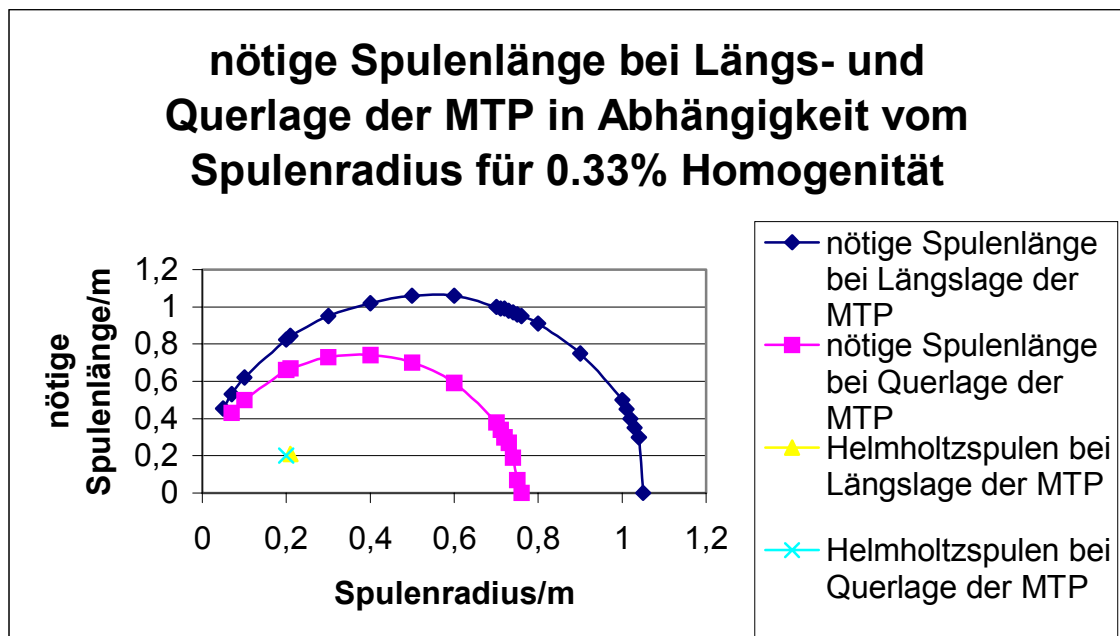


Abb. H2: Nötige Spulenlänge in Abhängigkeit vom Spulenradius bei Längs- und Querlage der MTP im Mittelpunkt der Spule bzw. symmetrisch zwischen den Helmholtzspulen. Bei Längslage liegt die längere MTP-Seite parallel zur Flächennormalen der Spule bzw. durch eine Spulenwindung aufgespannten Ebene, bei Querlage entspr. die kürzere Seite. Die Geometrie der Spule(n) sichert eine Homogenität der Feldverteilung von 0.33 % über die Fläche der MTP. Die Homogenität wurde durch Vergleich der magnetischen Feldstärken an neun über die Fläche der MTP verteilten Punkten ermittelt. Diese neun Punkte sind die vier Eckpunkte des Wellmittelpunkt-Rechtecks 100·64 mm², die vier Mittelpunkte der Rechteckseiten und der Mittelpunkt des recht-ecks. Keiner der acht Randpunkte durfte eine größere Abweichung des Betrages seiner magnetischen Feldstärke als 0.33 % von dem des Mittelpunktes haben. Nicht berücksichtigt wurden bei dieser Rechnung Effekte wie Verdunstung und Wärme-leitung.

Es gibt also zwei sinnvolle Möglichkeiten, die Spulen für die induktive Erwärmung zu gestalten: Entweder man nimmt eine lange Spule mit einem kleinen Radius oder man nimmt Helmholtzspulen.

Mit Hilfe von Gleichung (H12) sowie den ermittelten notwendigen Spulenabmessungen werden die magnetische Feldstärke H_S und das Windungszahl-Strom-Produkt $I \cdot w$ der Spulen berechnet (Tabelle H3).

Praktisch sind die hohen Windungszahl-Strom-Produkte bei den nötigen Frequenzen kaum erreichbar. Die Spulen müssen unverhältnismäßig große Abmessungen haben, um die geforderte Homogenität im Feldstärkeverlauf zu erreichen. Weiterhin ist die Speisung der Spulen mit Hochfrequenzstrom zu beachten: Bei einer relativ kleinen Windungszahl muß sehr viel hochfrequenter Strom zur Verfügung gestellt werden. Erhöht man die Windungszahl, um mit weniger Strom auszukommen, sinkt die Resonanzfrequenz der Spule wegen schnell zunehmender Wicklungskapazitäten stark ab. Der Einsatz von Kreuzwickelspulen, wie aus der HF-Empfängertechnik der analogen Ära bekannt, könnte ein Ausweg sein. Unabhängig davon kann man die Windungszahl und damit die Wicklungskapazität der Spule so groß wählen, daß sie bei der gewählten Betriebsfrequenz gerade in Parallelresonanz kommt. In diesem Fall steht eine deutlich höhere magnetische Feldstärke zur Verfügung als bei einfacher Speisung der Spule durch einen HF-Strom.

Feldstärken und Windungszahl- Strom-Produkte	H_S	$I \cdot w$	
		Helmholtzspulen $r=0.2 \text{ m}$	lange Spule $l=0.455 \text{ m}, r=0.05 \text{ m}$
$\omega=2 \cdot \pi \cdot 27.12 \text{ MHz}$	8346 A/m	2333 A	3797 A
$\omega=2 \cdot \pi \cdot 2.45 \text{ GHz}$	92.4 A/m	25.8 A	42 A

Tabelle H3: nötige magnetische Feldstärke H_S und Windungszahl-Strom-Produkte $I \cdot w$ für die Erwärmung einer Lösung mit 0.25°C/s , $d=7.3 \text{ mm}$, $\kappa=0.5 \text{ S/m}$, $\mu_r=1$ und den Frequenzen 27.12 MHz und 2.45 GHz; gerechnet jeweils für Helmholtzspulen ($I \cdot w = H_S \cdot r / 0.7155 \dots$) und eine lange Spule ($I \cdot w = H_S \cdot l$).

Die induktive Erwärmung von elektrisch leitenden Lösungen ist zwar technisch möglich, jedoch unökonomisch. Die felderzeugenden Spulen brauchen ein großes Bauvolumen, das zusätzlich eine Abschirmung aufweisen muß, damit die hochfrequenten Felder sich nicht weiter ausbreiten.

Aufgrund der betrachteten Erzeugung der Wärme direkt in der Lösung ist jeder Typ von MTP verwendbar. Auch eine auf die MTP geklebte Folie stört die Erwärmung nicht. Die bei der induktiven Erwärmung entstehenden Feldstärken $E(r_0)=29.9 \text{ V/cm}$ nach den Gleichungen (H7) und (H10) sowie die Frequenz von 2.45 GHz lassen vermuten, daß die induktive Erwärmung für die zu erwärmende Lösung das gleiche Gefährdungspotential besitzt wie die Mikrowellenerwärmung. Aufgrund der auftretenden Feldstärke $\underline{E}_\varphi(r)$ und der Frequenz von 2.45 GHz setzt bereits die dielektrische Erwärmung ein.

Nachteilig ist auf jeden Fall die Abhängigkeit der Erwärmungsgeschwindigkeit vom spezifischen elektrischen Leitwert. Dieser kann möglicherweise wegen einer geringen zur Verfügung stehenden Menge der Lösung nicht einfach bestimmt werden. Hinzu kommt, daß bei einer mit elektrisch unterschiedlich gut leitenden Lösungen befüllten MTP die Erwärmungsgeschwindigkeit in den Wells verschieden groß ist.

Die Verwendung eines elektromagnetischen Fernfeldes wegen der Homogenität der Feldstärke, wie bei der Mikrowellenerwärmung erwähnt, anstelle der induktiven Erwärmung einer Lösung ist nicht sinnvoll, weil schon im Nahbereich die benötigten magnetischen Feldstärken nur schwer realisiert werden können.

Es ist möglich, einen Aluminiumblock induktiv zu erwärmen, der z.B. eingepreßte Nunc-strips erwärmt. Dabei ist man wieder auf den Formschluß angewiesen, also auf einen bestimmten MTP-Typ. Andererseits können die Spulen mit niedrigerer Frequenz betrieben werden, weil der spezifische elektrische Leitwert von Aluminium mit $\kappa=41.7 \cdot 10^6$ S/m um acht Größenordnungen über dem der betrachteten Lösungen liegt. Wegen dem hohen Wärmeleitwert von Aluminium mit $\lambda=210$ W/(m·K) kann der Aluminiumblock zur Homogenisierung der Temperaturverteilung benutzt werden. Dann kann die Spulenordnung viel kleiner werden als ohne homogenisierenden Aluminiumblock (vgl. Abb. H2), weil die Homogenität nicht mehr über den Feldstärkeverlauf erzeugt werden muß. Vorteilhaft ist die Unabhängigkeit der erzeugten Leistung vom spezifischen elektrischen Leitwert der Lösungen. Nachteilig ist, daß während des Stromflusses durch die Spule starke Felder auftreten, die die Meßelektronik des Readers stören können. Diese Störungen werden vermieden, indem die Spule mit dem Aluminiumblock auf einer Position außerhalb der Meßposition erwärmt wird. Zum Messen während des Aufheizens muß der Spulenstrom abgeschaltet werden. Der Aluminiumblock dient innerhalb der Meßzeit als Wärmepuffer.

Ein anderer Gedanke ist die völlige räumliche Trennung von Erwärmungsvorrichtung und Meßelektronik. Letztere kann mit Ausnahme der optoelektronischen und mechanischen Komponenten des Meßkopfes als Einschubkarte in einem Rechner ausgeführt sein. Da ohnehin zu kommerziellen Readern gewöhnlich ein Steuerrechner gehört, ist ein Reader mit räumlicher Trennung von Meßkopf und Meßelektronik nicht weniger flexibel als einer mit der sonst verwendeten Kommunikation über die serielle Schnittstelle. Der Reader mit getrennten Komponenten ist nur nicht mehr im stand-alone-Modus betriebsfähig.

Der Gedanke, einen Aluminiumblock zu erwärmen und zur Homogenisierung zu verwenden, wird bei der indirekten Widerstandserwärmung realisiert. So kann man zwar auf die starken Felder verzichten, muß jedoch eine technologisch kompliziertere Konstruktion in Kauf nehmen, um die im Heizkörper integrierten wärmeerzeugenden Heizleiter elektrisch vom Heizkörper zu isolieren.

Um die Festlegung auf einen bestimmten MTP-Typ zu vermeiden, kann die MTP mit einer metallischen Schicht, z.B. Aluminium, versehen sein. Diese Schicht kann durch Bedampfen aufgebracht sein. Die MTP muß aber immer noch frei hängende Wells haben, um möglichst viel Außenfläche mit der Metallschicht zu versehen. Diese Metallschicht wird induktiv erwärmt und leitet ihre Wärme in das Well hinein. Vorteilhaft ist die mögliche Verwendung aller MTP mit frei hängenden Wells. Nachteilig ist das notwendige Aufbringen der metallischen Beschichtung und die mangelhafte Wärmeleitfähigkeit einer dünnen Metallschicht. Deshalb muß bei dieser Lösung die Homogenität der Temperaturverteilung wieder über den Verlauf der magnetischen Feldstärke erreicht werden, was Spulenabmessungen lt. Abb. H2 erfordert. Es können jedoch deutlich niedrigere Arbeitsfrequenzen verwendet werden.

I: Bestimmung der optimalen Schaltzeiten

Die Forderung aus der Aufgabenstellung lautet, die Lösungstemperatur möglichst schnell und ohne Überspringen zu erreichen. Sie kann mit Hilfe einer zeitoptimalen Steuerung erfüllt werden.

Es ist möglich, zur Erfüllung der Forderung das Pontrjaginsche Maximumprinzip einzusetzen. Das Streckenverhalten ist mit der Kennwertermittlung nach den Gleichungen (4.4) bis (4.6) bekannt, ebenso die elektrische Heizleistung als Stellgröße. Der zeitliche Verlauf der Stellgröße ist so zu wählen, daß das Optimierungskriterium, auch Gütemaß, erfüllt wird. Dazu wird die Hamilton-Funktion mit den Zustandsgleichungen und dem Gütemaß aufgestellt und der Verlauf der Stellgröße so gewählt, daß die Hamilton-Funktion zu jedem Zeitpunkt zwischen Startpunkt und Endpunkt des Zustandsvektors einen maximalen Wert einnimmt. Diese Vorgehensweise ist für jede Form des Gütemaßes (außer zeitoptimal auch z.B. energieoptimal) gültig. Die Aufgabe könnte so gelöst werden.

Weiterhin ist bekannt, daß ein Zeitoptimalität sicherndes Gütemaß stets zu einer Steuerung führt, bei der die Stellgröße abwechselnd ihre gegebenen Anschläge einnimmt [Föllinger 1994 S.151]. Damit gibt die Stellgröße also immer Sprünge auf die Strecke, d.h., die Reaktion der Strecke kann nur eine lineare Überlagerung von Sprungreaktionen sein. Die Struktur dieser Sprungreaktionen ist aber bekannt. Deshalb kann die Ausführung der einzelnen Schritte des Pontrjaginschen Maximumprinzips unterbleiben. Da die Strecke mit Gleichung (4.3) durch ein Modell 2. Ordnung beschrieben wird, kann die Stellgröße nur einmal umschalten (Satz von Feldbaum). Der Ausgangszustand sei ohne Beschränkung der Allgemeinheit der eingeschwungene Zustand mit $\vartheta(t=0)=0$ und $\vartheta'(t=0)=0$. Da die gewünschte Temperaturdifferenz positiv ist, muß die Stellgröße im Zeitintervall $0 \dots t_u$ (t_u : Umschaltzeit) den oberen Anschlag P_{Heiz} einnehmen, im Zeitintervall $t_u \dots t_e$ (t_e : Einschwingzeit) dann den unteren Anschlag $P_{\text{Kühl}}$. Bei $t=t_e$ muß die Stellgröße so eingestellt werden, daß der eingeschwungene Zustand gehalten wird: $P(t_e)=\Delta\vartheta/k_s$ und $P'(t_e)=0$. Man kann die Struktur der Lösung hinschreiben:

$$0 \leq t \leq t_u \quad \vartheta(t) = \vartheta_1 \cdot e^{t/\tau_1} + \vartheta_2 \cdot e^{t/\tau_2} + k_s \cdot P_{\text{Heiz}} \quad (11);$$

$$t_u \leq t \leq t_e \quad \vartheta(t) = \vartheta_3 \cdot e^{t/\tau_1} + \vartheta_4 \cdot e^{t/\tau_2} + k_s \cdot P_{\text{Kühl}} \quad (12);$$

$\vartheta(t)$ ist die Lösungstemperatur, τ_1 nach Gleichung (4.5), τ_2 nach Gleichung (4.6), $P_{\text{Heiz}}=87.3 \text{ W}$ nach Gleichung (4.2) und $P_{\text{Kühl}}=0$, da nicht gekühlt werden kann; $\vartheta_1 \dots \vartheta_4$ sind zu bestimmen. Setzt man in Gleichung (11) $t=0$ und $\vartheta(0)=0$ sowie in die hier nicht geschriebene erste zeitliche Ableitung von Gleichung (11) $t=0$ und $\vartheta'(0)=0$ ein, ergibt sich ein lineares Gleichungssystem 2. Ordnung für ϑ_1 und ϑ_2 . Die beiden anderen Größen ϑ_3 und ϑ_4 erhält man nicht so einfach, weil die Zeit t_e noch nicht bekannt ist. Man muß in Gleichung (12) $t=t_e$ und $\vartheta(t_e)=\Delta\vartheta$ sowie in die hier nicht geschriebene erste zeitliche Ableitung von Gleichung (12)

$t=t_e$ und $\vartheta'(t_e)=0$ einsetzen und das entstehende lineare Gleichungssystem 2. Ordnung für ϑ_3 und ϑ_4 allgemein lösen. Dann erhält man ϑ_3 und ϑ_4 in Abhängigkeit von t_e . Schließlich wird der Umschaltzeitpunkt t_u betrachtet: Im Umschaltzeitpunkt ($t=t_u$) müssen sowohl die Temperaturen $\vartheta(t_u)$ in den Gleichungen (I1) und (I2) als auch deren erste zeitlichen Ableitungen $\vartheta'(t_u)$ übereinstimmen: Dafür wird in den Gleichungen (I1) und (I2) $t=t_u$ gesetzt. Danach setzt man die rechten Seiten gleich. Man erhält eine Gleichung mit den zwei Unbekannten t_u und t_e . Diese Gleichung müssen nach ϑ_3 und ϑ_4 aufgelöst sein. Nun setzt man in die ersten zeitlichen Ableitungen der Gleichungen (I1) und (I2) ebenfalls $t=t_u$ und setzt dann wieder die rechten Seiten gleich. Man erhält eine weitere Gleichung mit den zwei Unbekannten t_u und t_e . Diese Gleichungen müssen ebenfalls nach ϑ_3 und ϑ_4 aufgelöst sein. Man hat jetzt zwei Gleichungen mit den zwei Unbekannten t_u und t_e . Die beiden Unbekannten befinden sich einzeln und als Differenz in den Exponenten der e-Funktionen. Es handelt sich um ein nichtlineares Gleichungssystem 2. Ordnung für t_u und t_e , welches mit der Methode von Newton-Kantorowitsch [Bronstein u.a. 1979 S.785] gelöst wurde. Die Startwerte für t_u und t_e brauchen nur grob ermittelt werden. Das Verfahren findet trotzdem die richtige Lösung. Bei dieser Aufgabe arbeitet die erwähnte Methode stabil. Letztlich kann auf die manuelle Vorgabe der Startwerte vollständig verzichtet werden. Da die Lösung für t_u und t_e immer in der Größenordnung der Zeitkonstanten nach den Gleichungen (4.5) und (4.6) liegt, kann das Ermitteln der Startwerte vor Aufruf des eigentlichen Lösungsalgorithmus vom Rechenprogramm selbst unschwer erledigt werden.

J: Abkürzungs- und Größenverzeichnis

a	Kalibrierkurvenparameter bei Fluoreszenzmessung
$A_{570\text{ nm}}$	Absorbanz bei einer Wellenlänge von 570 nm
b	Kalibrierkurvenparameter bei Fluoreszenzmessung
c	spezifische Wärmekapazität; Kalibrierkurvenparameter bei Fluoreszenzmessung
d	Lichtweg, Höhe der Lösung im Well, Schichtdicke
E	elektrische Feldstärke
$F_{405\text{ nm}}$	Fluoreszenzmeßwert bei Emission 538 nm und Anregung 405 nm
Greiner F-MTP	Mikrotiterplatte der Firma Greiner, <u>E</u> lachboden-Ausführung, 96 Wells
H	magnetische Feldstärke
IR	Infrarot
j	imaginäre Einheit, $=\sqrt{-1}$
J	Konvektionsstromdichte
k	Kalibrierkurvenparameter bei Absorbanzmessung
m	Kalibrierkurvenparameter bei Absorbanzmessung; Masse
M	Konzentration einer Lösung, 1 M=1 mol/l; Meßwert
MTP	Mikrotiterplatte
n	Kalibrierkurvenparameter bei Absorbanzmessung
p	komplexe Kreisfrequenz; Fluoreszenzverhältnis
P'	Leistung je Volumenelement
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration, pH-Wert
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
r_0	mittlerer Wellradius einer Greiner F-MTP, $\approx 3.25\text{ mm}$
s	empirische Standardabweichung
S	Absorbanzfunktion
t	Zeit
T	absolute Temperatur
V	Lösungsvolumen
VK	Variationskoeffizient
W	Energie
δ	Fehlergrenze

$\Delta\vartheta$	Temperaturdifferenz in °C
ε_0	absolute Dielektrizitätskonstante, = 8.85 pF/m
ϑ	Temperatur in °C
ϑ_0	Kalibrierkurvenparameter bei Absorbanzmessung
κ	spezifischer elektrischer Leitwert
λ	Wellenlänge
σ	Stefan-Boltzmann-Konstante, $=2\cdot\pi^5\cdot k^4/(15\cdot c^2\cdot h^3) = 5.67\cdot 10^{-8} \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-4}$
τ_m	Relaxationszeit des Wassers
ω	Kreisfrequenz

- Einzelne im Text unterstrichene Buchstaben sind Vektoren.
- Gestrichene Größen sind, soweit nicht anders bezeichnet, Ableitungen, auch nach der Zeit.
- Hier nicht aufgeführte Bedeutungen von Abkürzungen und Größen sind bei ihrer ersten Benutzung erklärt.
- Abkürzungen von Reagenzien sind im Anhang L: Reagenzien aufgeführt.
- Turbo Pascal ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Borland International Inc..

K: Geräte

- Pipettierroboter Igel mit Bedienoberfläche: Fa. OPALJENA GmbH
- absorbanzmessender Reader Typ 1400: Fa. Labsystems
- fluoreszenzmessender Reader Fluoroskan II: Fa. Labsystems
- chemilumineszenzmessender Reader Microlumat LB96P: Fa. EG&G Berthold
- Spektrophotometer Uvikon 933: Fa. Kontron Instruments
- Spektrophotometer Beckman UV-DU70: Fa. Beckman Coulter Instruments
- Spektrometer Lambda 19: Fa. Perkin Elmer
- Spektrometer System 2000: Fa. Perkin Elmer
- Spektrometer 2000 FT-IR: Fa. Perkin Elmer
- Spektrometer IFS 66: Fa. Bruker
- Mikrowelle (a) Typ HMT812A SS-578H, 900 W, mit Drehteller: Fa. Bosch; Typ des Magnetrons: 2M210-M1 C26-06031U(SP), Fa. Panasonic
- Mikrowelle (b) Typ R-2J28, 700 W, mit Drehteller: Fa. Sharp; Typ des Magnetrons: A195 OM525 S1, Fa. Sharp
- Schüttler DSG304M/4, Fa. Bibby Dunn Labortechnik GmbH
- Ultraschallbad UG 100, UW4A: VEB Elektromat Dresden
- 1-Kanal-Pipetten: Firmen Labsystems, Eppendorf und Brand
- 8-Kanal-Pipetten: Fa. Labsystems
- Intelligentes Sensormodul ISM 01 mit Bedienoberfläche: Fa. Gantner electronic
- elektronische Thermometer DTMS 32...42°C und DTMS 5...60°C: Fa. Thermometerwerk Geraberg
- Konduktometer 702: Fa. Knick
- pH-Meßgerät pMX 3000/pH: Fa. Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH Weilheim
- Präzisionswaagen MC1 Analytic AC210S und Laboratory LC620P: Fa. Sartorius
- Hand-Multimeter VOLTcraft M-3850 mit Thermoelement: Fa. Conrad Electronic

L: Reagenzien

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Phosphatpuffer ($\text{H}_2\text{KPO}_4 + \text{HK}_2\text{PO}_4$), Diethanolamin (DEA): Fa. Merck
- o-Kresolsulfonphtalein (=Kresolrot), p-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz (p-NPP), Rinder-Albumin: Fa. Serva
- 4-Methylumbelliferylphosphat (4-MUP), 4-Methylumbelliferon (4-MU): Fa. Sigma
- Fluorescein-Natrium, 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure Natriumsalz (HPTS): Fa. Fluka
- Natriumazid (NaN_3): VEB Sprengstoffwerk Schönebeck/Elbe
- Enzym alkalische Phosphatase (AP): aus Kälberdarm gewonnen
- Natriumchlorid (NaCl): VK Labor- und Feinchemikalien, Germed, DDR

M: Software

- Bedienoberfläche des absorbanzmessenden Readers einschließlich Berechnung der Lösungstemperaturen mit Hilfe des optischen Thermometers nach [Schilling u.a. 1993/1]: Turbo Pascal-Produkt, entstanden im Institut für Biochemie 1
- Bedienoberfläche der dazugehörigen Temperierung: Turbo Pascal-Produkt, entstanden bei Fa. OPALJENA GmbH und im Institut für Biochemie 1
- Bedienoberfläche Serocalc for Windows des fluoreszenzmessenden Readers: Fa. DEMOS Computers
- Datenkonvertierung zur vergleichbaren Auswertung der Meßergebnisse der optischen Thermometer von absorbanz- und fluoreszenzmessendem Reader: Turbo Pascal-Produkte, entstanden im Institut für Biochemie 1
- Algorithmus zur Bestimmung der Lösungstemperaturen im fluoreszenzmessenden Reader: [Cumme 1998]

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Biochemie 1 an der FSU Jena.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. R. Grünwald von der TU Ilmenau sowie Herrn Prof. Dr. med. habil. A. Horn von der FSU Jena für die Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Zentralwerkstatt der medizinisch-theoretischen Institute an der FSU Jena, namentlich Herrn Ditze und Herrn Sammler.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie 1 an der FSU Jena bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung, besonders bei Frau Poppitz, bei Herrn Dr. Schilling und bei Herrn Dr. Cumme.

Herrn Dr. Blumröder von der TU Ilmenau danke ich für Bemerkungen, Hinweise, Kritiken und Diskussionen im Zusammenhang mit der Entstehung der Arbeit.

Ich danke weiterhin Frau Prof. Dunken, Frau Weber, Frau Gittler und Herrn Poppitz für die Aufnahme von Emissions- bzw. Transmissionsspektren. Ebenso danke ich den Studenten an der FSU Jena, die 1998 ihr Studentenpraktikum am Institut für Biochemie 1 bei der Arbeitsgruppe Prof. Horn durchführten, für die Aufnahme von Kalibrierkurven und Messung von Heizzeiten. Von ihnen seien stellvertretend Sina Klarner und Sven Rupprecht genannt.

Herrn Dr. F. Räbel danke ich für die anspruchsvolle Übersetzung der Zusammenfassung ins Englische.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Bibliothekszeitstelle Medizinisch-Theoretische Institute, besonders Fr. Hufe, die viel Mühe für die Literaturbeschaffung aufwandten.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Frau und unseren beiden Kindern für ihre starke Rücksichtnahme und große Toleranz über fünf Jahre hinweg. Ohne deren oftmaligen Verzicht auf gemeinsame Unternehmungen, Abende, Wochenenden und Urlaubstage oder ohne deren häufige Übernahme häuslicher und familiärer Aufgaben wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen, ebenso nicht ohne die positive Meinung meiner Frau während schwieriger Phasen.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Fr. Prof. Dunken, Fr. Weber: Messung von Emissionsspektren
2. Fr. Gittler, Hr. Poppitz: Messung von Transmissionsspektren
3. Sina Klarner und Sven Rupprecht stellvertretend für Studenten des Studentenpraktikums 1998 an der FSU Jena, Institut für Biochemie 1, Arbeitsgruppe Prof. Horn: Aufnahme von Kalibrierkurven, Messung von Heizzeiten
4. Hr. Dr. Räbel: Übersetzung der Zusammenfassung ins Englische

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich bin darauf hingewiesen worden, daß die Unrichtigkeit der vorstehenden Erklärung als Täuschungsversuch angesehen wird und den erfolglosen Abbruch des Promotionsverfahrens zur Folge hat.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Thesen

1. Für die Untersuchung von Analysengut mit optischen Methoden werden in medizinischen Labors in großem Umfang Mikrotiterplatten (MTP) eingesetzt. Sie bestehen im häufigsten Fall aus 96 Mikroküvetten mit einem Einzelvolumen von 50...350 µl.
2. Ist in das Meßgerät, den sog. Reader, eine Heizung für das in der MTP befindliche Analysengut eingebaut, handelt es sich um einen temperierbaren Reader. Diese erlauben Aussagen über temperaturabhängige Eigenschaften des Analysengutes.
3. Eine Reihe biochemischer und medizinischer Applikationen verlangt eine schnelle und homogene Temperierung des Analysengutes. Die Aufheizzeit soll bei 1...2 min und die Homogenität bei 0.1°C liegen. Bisher bekannte Reader benutzen Luft als Wärmeübertragungsmedium und erreichen Aufheizzeiten von Umgebungstemperatur auf 37°C von 10...20 min sowie Homogenitäten von 0.4°C. Solche Reader sind für die schnelle homogene Temperierung von Analysengut in MTP nicht geeignet.
4. Beim absorbanzmessenden Reader beträgt die Unsicherheit der mittels des optischen Thermometers gemessenen Temperatur 0.1°C bei 37°C die Variationsbreite bei Wiederholung der Kalibrierkurve 1.1°C bei 35°C und der Fehler durch Degeneration des optischen Thermometers -0.1°C nach 20 min. Die entsprechenden Zahlen beim fluoreszenzmessenden Reader sind 0.15°C 0.4°C bei 35°C und -0.59°C nach 15 min.
5. Das optische Thermometer auf der Basis TRIS-Kresolrot ist im Temperaturbereich 5...50°C einsetzbar, das auf der Basis TRIS-HPTS zumindest im Bereich 25...50°C.
6. Zur Verhinderung der Wärmeableitung aus den Randwells, der Verdunstung und des Beschlagens der Detektoroptik ist der Einbau einer zusätzlichen Dachheizung erforderlich. Sie hält das Luftvolumen über der MTP und die Detektoroptik auf einer geringfügig höheren Temperatur als die der Lösung.
7. Das Heizverfahren metallischer Heizkörper mit integrierter Heizfolie funktioniert auch bei einer auf die MTP aufgeklebten Folie. Es treten keine zusätzlichen Belastungen des Analysengutes auf. Messungen während des Aufheizens sind ohne Einschränkung möglich. Das Heizsystem bestehend aus Heizkörper und Dachheizung kann in den Reader Fluoroskan II eingebaut werden. Stromversorgung und Steuerelektronik finden keinen Platz mehr im Reader. Da nur branchenübliche Heiz- und Bearbeitungsver-

fahren eingesetzt und auch keine einzelnen extrem teuren Komponenten benötigt werden, kann der angestrebte Preis von 3...4 TDM voraussichtlich gehalten werden. Von allen hier realisierten Erwärmungsarten erweist sich die Variante eines metallischen Heizkörpers mit integrierter Heizfolie als geeignetste. Sie erfüllt alle Forderungen der Aufgabenstellung mit Ausnahme des Bauvolumens und der Anwendbarkeit für verschiedene MTP-Typen.

8. Die verwendeten Dunkelstrahler haben eine so geringe Oberflächentemperatur, daß der Hauptteil der emittierten Leistung im Wellenlängenbereich oberhalb $1.4\text{ }\mu\text{m}$ abgestrahlt wird. Für die Erwärmung der Lösung durch IR-Strahlung ist die Absorption von Wasser maßgebend. Die durch die gelösten Stoffe hervorgerufene Absorption ist vernachlässigbar gering. Die Erwärmungsgeschwindigkeit ist unabhängig von den im Wasser gelösten Stoffen.
9. Im Gegensatz zu Dunkelstrahlern verursachen die verwendeten Hellstrahler keine Wärmeschäden an der MTP.
10. Alle drei verwendeten Halogenstrahler zeigen ohne homogenisierenden Metallblock mit Bewegung zu schlechte Homogenitäten über die MTP infolge zu warmer Randwells. Maßnahmen zur Abdeckung des MTP-Randes sind nicht wirksam genug, um die Homogenität auf Werte um 0.1°C zu bringen.
11. Für eine beste Homogenität von $0.12\ldots 0.28^{\circ}\text{C}$ mit homogenisierendem Aluminiumblock ist das Bewegen des 1000 W-Strahlers relativ zur MTP während des Aufheizens notwendig.
12. Mikrowellengeräte sind für die Erwärmung des Analysengutes nicht geeignet. Es entstehen auch mit Drehteller sehr große Temperaturunterschiede von Well zu Well.
13. Das optimale Heizregime für den Heizkörper des absorbanzmessenden Readers besteht im Anlegen einer vom Lösungsvolumen abhängigen zeitlich konstanten Leistung für die optimale Heizzeit. Nach Ablauf der Einschwingzeit wird die Lösungstemperatur ohne Überschwingen erreicht.
14. Die Vorausberechnung der optimalen Heizzeit ist mit Hilfe der Grundgleichung der Wärmelehre möglich. Die Voraussage der Einschwingzeit ist auf Grundlage eines Modells möglich.

